UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1962 N° 200

Etude de Bacteries après examen au Microscope Electronique sous différentes Tensions d'Accélération à l'aide d'une Cellule Porte-Objet

THÈSE

POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ

(Mention Pharmacie)

Présentée et soutenue publiquement en Mai 1962

PAR

JEANNINE JOLIVET-ARGAGNON

Pharmacien

Membres du Jury

M. G. ANDRIEU	Président
Mmes DULUCQ-MATHOU	Assesseurs
ENJALBERT	
MM. BREUILLAUD	Suppléant
BRU	

IMPRIMERIE SOUBIRON

9, Rue de la Poste

TOULOUSE

UNIVERSITE DE TOULOUSE

FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

TABLEAU DU PERSONNEL

DOYEN : Monsieur LAZORTHES
1er ASSESSEUR : M. BLANC
2ème ASSESSEUR : M. CADENAT E.
DOYENS HONORAIRES : Messieurs GORSE, CALVET, LEFEBVRE, BRUSTIER.
PROFESSEURS HONORAIRES : Messieurs RIBAUT, VALLOIS, CLERMONT, NANTA, DUCUING, TAPIE, DELAS, RISER, SOULA.

SECTION MEDECINE

PROFESSEURS

Clinique médicale	MM. MERIEL
Clinique médicale	GADRAT
Clinique chirurgicale et gynécologique	FABRE Pierre
Clinique chirurgicale et du cancer	GRIMOUD
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	VIRENQUE
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	BAZEX
Clinique des maladies de la tuberculose et pathologie interne	MOREL
Clinique des maladies des voies urinaires	LHEZ
Clinique médicale infantile et puériculture	SOREL
Clinique neurologique et psychiâtrique	GERAUD
Clinique obstétricale	GUILHEM
Clinique odonto-stomatologique	CADENAT Etienne
Clinique ophtalmologique	CALMETTES
Clinique ORL et chirurgie maxillo-faciale	CALVET
Clinique rhumatologique	RUFFIE René
Clinique traumatologique des membres	RIEUNAU
Accouchement et obstétricie sociale	PONTONNIER
Anatomie	LAZORTHES
Anatomie appliquée	POULHES
Anatomie pathologique	FABRE Jacques
Bactériologie, Hygiène et Médecine sociale	ANDRIEU
Chimie biologique	VALDIGUIE
Electro-radiologie	MARQUES
Embryologie générale	BROUSSY Jean
Histologie	BIMES
Hydrologie thérapeutique et climatologie	DARNAUD
Médecine légale et médecine du travail	PLANQUES
Médecine sociale	BOUNHOURE
Parasitologie	BOUISSET
Pathologie chirurgicale	DAMBRIN
Pathologie générale et médecine expérimentale	SENDRAIL
Physico-chimie	AUVERGNAT
Physiologie	LAPORTE Yves
Physiologie appliquée et pharmacologie	BAISSET
Physique biologique et médicale	BUGNARD
Propédeutique médicale	N...
Thérapeutique	DARDENNE

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Anatomie générale et comparée	COULOUMA
Pathologie médicale	LAPORTE Jacques
Bactériologie	Mme ENJALBERT

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Biochimie médicale	MM.	DOUSTE-BLAZY
Physique médicale		BRU

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Anatomie	BASTIDE
Anatomie pathologique	BOUISSOU
Anesthésiologie	LARENG
Carcinologie	ESTRADE
Histologie et embryologie	PLANEL
Parasitologie	RUFFIE Jacques
Pathologie expérimentale	GLEIZES
Physiologie	MONTASTRUC
Physiologie	BESSOU
Physique médicale	COMMANAY

AGREGES

Médecine générale	MONNIER
d°	RIBAUT
d°	DELAUDE
d°	CALAZEL
d°	RASCOL
Chirurgie générale	ENJALBERT
d°	FICAT
d°	PASQUIE
d°	SOUQUET
d°	SARRAZIN
Dermatologie et syphiligraphie	DUPRE
Hydrologie	DENARD
Médecine légale	GREZES-RUEFF
Obstétrique	ESPAGNO
Odontostomatologie	CADENAT Henri
Pédiatrie	BARDIER

AGREGES LIBRES

Anatomie	THOMAS
Ophtalmologie	DEODATI
O.R.L.	CLAUX
Pathologie chirurgicale	DIEULAFE

SECTION PHARMACIE

PROFESSEURS

Botanique et cryptogamie	Mme	DULUCQ-MATHOU
Chimie analytique, toxicologie et hygiène industrielle	MM.	BOURBON
Chimie pharmaceutique		BLANC
Matière médicale		VINCENT
Pharmacie chimique et pharmacodynamie		CAUJOLLE
Pharmacie galénique		STANISLAS
Zoologie		ROUX

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Pharmacie	COUTURIER

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Sciences naturelles	Mme	CAUJOLLE

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Microbiologie	BREUILLAUD
Sciences physiques	PITET
Toxicologie	BROUSSY Georges

PERSONNEL ADMINISTRATIF

Secrétaire Principal	ROCHE
Secrétaire	BERRUT

La Faculté déclare n'être pas responsable des opinions émises par les candidats (Délibération en dæe du 12 Mai 1891).

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1962 N° 200

Etude de Bacteries après examen au Microscope Electronique sous différentes Tensions d'Accélération à l'aide d'une Cellule Porte-Objet

THÈSE

POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ

(Mention Pharmacie)

Présentée et soutenue publiquement en Mai 1962

PAR

JEANNINE JOLIVET-ARGAGNON

Pharmacien

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Membres du Jury

M.	G. ANDRIEU	Président
Mmes	DULUCQ-MATHOU	Assesseurs
	ENJALBERT	
MM.	BREUILLAUD	
	BRU	Suppléant

IMPRIMERIE SOUBIRON

9, Rue de la Poste

TOULOUSE

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546525_0032

Etude de Bacteries après examen au Microscope Electronique sous différentes Tensions d'Accélération à l'aide d'une Cellule Porte-Objet

A tous les miens.

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur G. ANDRIEU

Professeur de Bactériologie, hygiène et de Médecine Sociale

Chevalier de la Légion d'Honneur

Vous nous avez fait le très grand honneur d'accepter la présidence de cette thèse. Nous sommes très heureux de vous exprimer notre admiration et notre respectueux dévouement.

A NOTRE JURY DE THESE

Madame le Professeur DULUCQ-MATHOU

Professeur de Botanique et Cryptogamie

Madame le Professeur L. ENJALBERT

Professeur à la Faculté

Vous avez bien voulu nous confier ce travail, il est le fruit de la collaboration de l'équipe que vous avez su réunir et que vous dirigez avec bienveillance, avec l'équipe du Laboratoire d'Optique Electronique du Centre National de la Recherche Scientifique.

C'est un modeste témoignage de notre profonde gratitude et de notre attachement.

Monsieur le Professeur BREUILLAUD

Maître de Conférences, Agrégé de Microbiologie

Monsieur le Professeur BRU

Professeur à la Faculté

A tous vont nos remerciements pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant de juger notre travail.

A Monsieur le Professeur G. DUPOUY

Membre de l'Institut
Directeur Général Honoraire du C.N.R.S.
Directeur du Laboratoire National d'Optique Electronique du C.N.R.S.
Doyen Honoraire de la Faculté des Sciences de Toulouse
Commandeur de la Légion d'Honneur.

Vous nous avez accueilli dans votre magnifique laboratoire. Votre très haute bienveillance a permis la réalisation de ce travail dans le centre de rechercher que vous animez et dirigez. Que ma reconnaissance et mon admiration soient pour vous les gages de mon respectueux dévouement.

A Monsieur le Professeur F. PERRIER

Professeur à la Faculté des Sciences
Directeur adjoint du Laboratoire d'Optique Electronique
du C.N.R.S.
Chevalier de la Légion d'Honneur.

Nous avons trouvé auprès de vous un conseil judicieux et cordial.

Nous vous prions de croire à notre profonde gratitude.

A nos Maîtres de la Faculté de Pharmacie de PARIS.

A nos Maîtres de la Faculté de Médecine
et de Pharmacie de TOULOUSE.

Au Laboratoire d'Optique Electronique du Centre National
de la Recherche Scientifique de TOULOUSE.

Au Laboratoire de Bactériologie
du Centre Hospitalier Régional de PURPAN.

Au Laboratoire d'Hygiène et de Médecine Sociale
et de la Chaire de Bactériologie
de la Faculté de Médecine de TOULOUSE.

A V A N T - P R O P O S

". .... Le fait que dans les microscopes classiques la substance a observer est sous vide poussé (c'est-à-dire qu'ils sont deshydratés et perdent les liquides volatils qu'ils contiennent) limite d'une façon considérable les micro-organismes qui résistent a cette condition imposée .....

... Une tendance est l'emploi de tensions d'accélération de plus en plus élevées.....

... Il est probable que dans les microscopes à très haute tension des études de ce genre pourraient avoir lieu dans des conditions plus favorables que dans les microscopes actuels."

1 950. Th. REIS

Le microscope electronique et
ses applications.

"..... On peut THEORIQUEMENT envisager, pour éclairer l'objet, des ondes associées à des électrons rapides.

... Il se peut que l'étude des bactériophages et des virus soit le point de départ d'une grande aventure dans le domaine de la connaissance scientifique".

1 951. G. DUPOUY

Elements d'Optique Electronique

INTRODUCTION

Dans tous les microscopes électroniques classiques, la matière vivante n'est examinée qu'après de multiples préparations. Ceci afin d'éviter au maximum la deshydratation et l'éclatement dus au vide poussé qui existe dans les appareils. Les bactéries sont fixées, ombrées, etc. Dans ces conditions jamais encore on a pu réaliser l'observation directe de la matière vivante. Cet examen fut réalisé avec un appareil fonctionnant sous très haute tension par M.M. Gaston DUPOUY, Frantz PERRIER & Louis DURRIEU (3).

Les bactéries sont placées dans des porte-objet spéciaux adaptés à chacun des types de microscope électronique utilisés. Bacilles et spores sont protégés du vide régnant dans l'appareil, et sont soumis à des examens dans les conditions habituelles.

Nous démontrons d'abord que les bactéries ne donnent pas de culture post - électroniques quand elles sont exposées directement au vide et au rayonnement. Nous n'obtenons pas non plus de culture post-électronique quand nous opérons avec un appareil classique sous une tension de 80 Kv. (Une exception pour une forme sporulée). Si nous utilisons un appareil fonctionnant sous très haute tension, 750 Kv et 1 000 Kv nous pouvons aussi bien à partir de formes sporulées que à partir de formes bacillaires obtenir des cultures post-électroniques. L'observation des bactéries vivantes est un fait nouveau, d'un très grand intérêt. Ces bactéries vivantes qui ont pu se reproduire à la sortie du microscope électronique en donnant une culture post-électronique sont l'objet de l'étude que nous allons présenter.

REMERCIEMENTS -

Ce travail n'est pas l'oeuvre d'un seul. Il est le résultat d'une étroite coopération. Réalisé au Laboratoire d'Optique Electronique du Centre National de la Recherche Scientifique à Toulouse, avec la collaboration du Laboratoi-

re de Bactériologie du Centre Hospitalier Régional de Purpan, et du Laboratoire de la chaire de Bactériologie, Hygiène et Médecine Sociale de la Faculté de Médecine de Toulouse. Nous tenons à remercier très vivement tous ceux qui nous ont prodigué leur précieuse collaboration.

A M. le PROFESSEUR G. DUPOUY, dont la haute bienveillance a permis la réalisation de ce travail effectué dans le Laboratoire qu'il anime et dirige, nous adressons notre respectueuse reconnaissance.

Que M. le PROFESSEUR G. ANDRIEU, qui a bien voulu présider notre jury de Thèse, trouve ici avec notre reconnaissance nos respectueux remerciements.

Que Mme le PROFESSEUR L. ENJALBERT, qui a bien voulu guider nos premiers pas dans la vie du Laboratoire de Recherche, et qui a bien voulu diriger notre travail, trouve ici l'expression de notre affectueuse reconnaissance.

Que M. L. DURRIEU, Ingénieur de Recherche, trouve ici nos remerciements pour l'aide précieuse qu'il nous a apportée dans ce travail délicat.

Nous tenons tout particulièrement à remercier le personnel du Laboratoire d'Optique Electronique du Centre National de la Recherche Scientifique de Toulouse, qui nous a apporté un concours efficace dans la réalisation de ce travail et plus particulièrement, M. C. JOURET Physicien adjoint, MM. E. BARBEY & G. GONTRAN Photographes, ainsi que Mme J. RZEPKA, et MM. G. PEUCH et P. VIGNAUX Techniciens.

DIFFERENTES METHODES ET TECHNIQUES UTILISEES

Le but que nous nous sommes fixés nous a imposé l'emploi de techniques spéciales d'observation : "cellule" pour le Microscope Electronique fonctionnant sous très Haute Tension "sandwich" pour l'ELMISKOP SIEMENS Nous n'avons cependant pas pour cela éliminé les anciennes méthodes de routine utilisées en microscopie électronique. Elles nous ont fourni au contraire un lien en nous donnant des images connues comparables aux nôtres. Nous allons exposer successivement toutes ces techniques d'observation, spéciales et de routine.

Nous envisagerons ensuite quelle fut la technique de prélèvement mise au point. Nous terminerons l'exposé des techniques utilisées en exposant la méthode choisie pour stériliser le nouveau matériel indispensable à nos expérimentations.

A - TECHNIQUES D'OBSERVATION SPECIALES

Nos études ont porté sur l'utilisation de deux appareils : pour chacun d'eux une technique spéciale fut mise au point au Laboratoire d'Optique Electronique du Centre National de la Recherche Scientifique.

1) TECHNIQUES EMPLOYEES POUR L'ETUDE DES GERMES AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE FONCTIONNANT SOUS TRES HAUTE TENSION, DANS LE BUT D'ETUDIER L'ACTION LETALE OU NON DU FAISCEAU ELECTRONIQUE SUR DES BACTERIES.

Pour le microscope électronique fonctionnant sous très haute tension (M.E.H.T.) l'on a substitué au porte objet habituel une "cellule". Cette cellule porte-objet est décrite en détails dans une note présentée à l'Académie des Sciences le 19-12-1961 par MM. Gaston DUPOUY, Frantz PERRIER

Louis DURRIEU (3).

Cette cellule porte objet composée de plusieurs éléments forme une boite étanche dans laquelle on dispose le matériel bactérien à examiner. L'étanchéité est assurée par le serrage des différentes pièces métalliques et des joints tout en emprisonnant une lame d'air dans la cellule. La pièce métallique percée d'un pertuis que nous appellerons fenêtres est recouverte par une membrane de parlodion-carbone, qui ferme le pertuis. Cette membrane est effectuée selon la technique utilisée quotidiennement dans le Laboratoire d'Optique Electronique de Toulouse. Technique qui fut mise au point par Mr. Roger DARGENT (1). Puis par M.M. Roger DARGENT, Louis DURRIEU et Mme Jacqueline RZEPKA (2). Avant d'utiliser ces fenêtres porte-objet on éprouve leur étanchéité et leur solidité. Dans ce but, on soumet chaque fenêtre à la pression de 5.10^{-5} mmHg. à l'aide d'un appareil à vide. Les fenêtres qui n'ont pas satisfait à l'examen sont éliminées.

Sur les fenêtres ainsi sélectionnées, l'objet à examiner est déposé. Le dépôt se fait côté carbone. La bactérie choisie est généralement ensemencée la veille afin d'obtenir une culture sur gélose ordinaire de 24 h à 37°. Un prélèvement de cette culture permet de faire une suspension dans un ou deux ml d'eau distillée stérile au travers de laquelle on ne doit pas pouvoir distinguer un texte imprimé.

Dans une première série d'expériences nous avons opéré comme suit. Une goutte de la suspension est déposée sur la fenêtre avec une pipette Pasteur très effilée prenant certaines précautions afin de ne pas déchirer les membranes. La technique qui nous a donné le plus de satisfaction et les meilleurs résultats est la suivante. On plonge l'extrémité de la pipette passée à la flamme et refroidie dans le tube contenant la suspension bactérienne. Par capillarité le liquide monte. On retire la pipette en la maintenant bien droite. Le poids du liquide contenu dans l'extrémité du tube capillaire fait sourdre une fine gouttelette. D'un mouvement de bascule on ramène la goutte tangentiellement le long de la parois de verre. La goutte est prête à être déposée sur la membrane tendue au dessus

du pertuis. A l'aide d'une loupe binoculaire on observe le moment ou le liquide s'évapore. C'est l'instant que nous avons choisi pour fermer la cellule qui était déjà partiellement montée. La fenêtre humide avec son dépôt est mise en place et on ferme en ce faisant la cellule. Il ne reste plus qu'à serrer puis centrer les deux fenêtres. Il est essentiel de réaliser la coaxialité de ces deux fenêtres d'une façon parfaite pour un bon examen électronique. De cette façon la totalité de la préparation est examinable, par suite toutes les bactéries sont irradiées au cours d'un examen.

Nous avons du par la suite modifier cette méthode pour les raisons suivantes. Le dépôt fait avec la pipette Pasteur débordant légèrement, on pourrait nous faire une critique immédiate car la zone des dépôts des bactéries déborde la surface irradiée. Nos repiquages risquaient après l'examen électronique de porter sur des bactéries déposées en dehors de la zone irradiée, ramenées au centre de cette zone soit par le mouvement spontané des bactéries, soit par les manipulations de prélèvement.

Cette considération nous a amené à apporter les modifications suivantes à notre technique de dépôt. Pour effectuer ce dépôt sur le pertuis fermé par le membrane de Parlodion-carbone, nous avons fait une micro-anse de platine. C' est une petite baguette de verre à l'extrémité de laquelle on a fixé un fil de platine très fin. Nous avons choisi un fil de platine de 1/10 de mm de diamètre. L'extrémité de ce fil est recourbée en crochet (Par expérience une boucle fermée effectue un dépôt beaucoup plus important que celui effectué avec le même fil recourbé en crochet), ceci facilite également le centrage de la goutte.

2) TECHNIQUES UTILISEES POUR L'OBSERVATION DES BACTERIES AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE ELMISKOP SIEMENS DANS LE BUT D'ETUDIER L'ACTION LETALE OU NON DU FAISCEAU ELECTRONIQUE SUR LES BACTERIES.

Pour le microscope électronique ELMISKOP SIEMENS on a substitué au porte-objet habituel un "sandwich" (4).

Le "sandwich" a pour but principal d'enfermer entre deux membranes des bactéries, et un peu d'air pour les

protéger de l'action du vide. Le "sandwich" est supporté par un petit diaphragme de platine de la taille d'une grille, percé en son centre. L'ouverture de ce pertuis est de 70µ. Dans un premier temps on prépare sur ce diaphragme un film parlodion carbone dans les conditions habituelles. La solidité de ce revêtement est systématiquement éprouvée à l'appareil à vide. Les membranes doivent supporter une pression de 5.10^{-5} mmHg. On utilisera pour le dépôt des germes la suspension précédemment définie. A l'aide de la micro-anse nous pourrons effectuer le dépôt. Nous n'emploierons plus que cette méthode pour tous les dépôts de germes pour examen électronique. Le dépot fait, nous observerons à la loupe binoculaire le moment précis où le liquide servant de véhicule s'évapore. Le diaphragme sera alors placé sur une petite tige métallique de meme diamètre, maintenue au préalable à zéro degré. Rapidement il se forme de fines gouttelettes sur toute la surface métallique et sur le pertuis recouvert par la membrane et le dépôt bactérien. Les germes se trouvent par la même occasion légèrement humides. C'est à ce moment précis bien déterminé que l'on coiffe ce diaphragme porte-objet et son objet humide avec une membrane de parlodion. L'humidité réalisée par l'artifice précédent joue deux roles. Premièrement elle réalise l'étanchéité des deux films qui se trouvent soudés sur les bords. On peut fort bien le voir par un simple examen à la loupe binoculaire. Deuxièmement, elle réhumidifie les bactéries destinées à l'examen électronique. Dès que l'ensemble sandwich-porte-objet est revenu à la température ambiante on peut procéder à un examen et l'introduire dans le microscope.

NOTA - Le sandwich ainsi confectionné renferme entre les deux membranes étanches les germes à examiner, un peu humides, il renferme également de l'air. Cet ensemble réalise en d'excellentes conditions pour l'examen que nous envisageons une micro-chambre à gaz (4).

B - TECHNIQUES UTILISEES POUR L'EXAMEN DE LA MORPHOLOGIE DES BACTERIES

Nous avons aussi utilisé les techniques de routine en microscopie électronique dans le but de réaliser un lien entre les images microphotographique classiques et celles que nous avons obtenues en utilisant ces méthodes originales.

Les techniques de routine que nous avons utilisées portent sur des germes frais non fixés au préalable. Nous nous bornerons à citer ces méthodes sans entrer dans les détails. Nous ferons cependant une exception pour la méthode des répliques.

Nous avons utilisé :

a) Dépôt sur grille d'une suspension de germes.

b) Dépôt sur grille d'une suspension de germes suivie d'un ombrage léger au chrome. (α = 25° : e = 10 Å)

c) Répliques. (Pseudo-réplique).

Pour cette technique un peu particulière nous nous sommes inspirés des travaux publiés ces dernières années. D'une part ceux de James HILLIER, Georges KNAYSI, et Richard BAKER (7). D'autre part la très intéressante technique utilisant des films de carbone dans la préparation de pseudo-répliques par D.B. SCOTT et R.G.W. WYCKOFF (11).

Après quelques essais nous avons mis au point la méthode suivante qui nous a donné entièrement satisfaction.

Initialement partis d'une culture en milieu liquide, (bouillon ordinaire ou bouillon glucosé), de la nuit, au maximum une culture de 24 h., nous avons ensemencé largement la surface d'une boîte de pétri avec le bouillon de culture selon une technique bien connue utilisée journellement pour tous les antibiogrammes. La boite ensemencée de cette façon est mise à l'étuve à 37° pendant un temps variable. Pour une bactérie de pousse rapide nous avons seulement laissé l'incubation se poursuivre pendant deux ou trois heures. Nous n'avons jamais laissé l'incubation se poursuivre

jusqu'à ce que la pousse soit visible. Nous avons repéré au microscope optique les régions susceptibles d'être prélevées et les avons marquées sur le fond de la boîte. La surface ensemencée étant bien sèche, nous répandons quelques gouttes d'une solution à 1 % de Parlodion dans l'acétate d'amyle. D'un geste bref nous réalisons son étalement et nous laissons sécher à l'étuve à 37° la boîte inclinée. La position inclinée favorise l'écoulement du liquide en excédent et permet de l'éliminer La pellicule de parlodion bien sèche sera découpée avec un scalpel stérile à environ un cm du bord. A l'aide d'une pipette nous introduirons entre la gélose et le film de plastique de l'eau distillée de façon à décoller la membrane et entrainer les bactéries en même temps.

Délicatement aux endroits marqués repérés optiquement, on déposera les petites grilles porte-objet sur la membrane flottante Il est préférable de laisser quelques instants l'adhérence se faire entre la grille et le support.

Avec un papier fort, découpé selon un diamètre inférieur à celui de la boite de pétri, préalablement mouillé, déposé sur la membrane flottante portant les grilles, on retourne le tout sur un papier filtre et on porte l'ensemble dans un dessicateur

Les petites grilles se détachent facilement du papier, il ne reste plus à ce moment que l'évaporation de carbone à effectuer de façon à obtenir un film de carbone d'une épaisseur de 200°. A environ

A ce moment sur nos grilles porte-objet nous avons de bas en haut : la grille, le film de parlodion ; les germes entrainés ; le film de carbone

Pour éliminer le parlodion nous plaçons nos petites grilles sur une toile métallique à mailles fines côté métal. Le tout dans une boite de pétri contenant environ 10 ml d'acétate d'amyle Le liquide doit seulement effleurer le dessus de la toile métallique en ne mouillant que la partie inférieure des grilles. C'est le stade le plus délicat de l'opération Le carbone mouillé par l'acétate d'amyle est très fragile Sa manipulation demande beaucoup de précau-

tions. Le contact avec le solvant sera maintenu pendant une heure. Pour faciliter la dissolution une agitation douce est recommandée afin de rendre plus intime le contact entre le solvant acétate d'amyle, et le parlodion soluble. La dissolution terminée la toile métallique sera portée dans un dessicateur jusqu'au lendemain. Les grilles, parfaitement sèches où "pseudo-répliques" sont prêtes pour un examen electronique. La grille porte-objet ne portent plus que les germes à étudier sous un film de carbonne.

En général nous nous sommes contentés du film de carbone sans ombrage. On peut cependant procéder à un ombrage au chrome dans les conditions habituelles.

C - TECHNIQUES DE PRELEVEMENT DES BACTERIES APRES UN EXAMEN ELECTRONIQUE

Le problème qui se présentait à nous était de ne prélever que le fragment central des membranes recouvrant le pertuis de chaque porte-objet spécial, cellule ou sandwich.

Dans ce but M.M. Gaston DUPOUY, Frantz PERRIER et Louis DURRIEU (3) ont mis au point une technique très précise. Des filaments de tungstène étirés, sorte d'emporte-pièces, permettent de découper la partie centrale de la membrane recouvrant le pertuis sur laquelle est déposé l'échantillon à examiner. Cette manipulation étant exposée dans tous ses détails dans le compte rendu à l'Académie des Sciences précité, nous ne l'exposerons pas ici (1).

Le prélèvement fait, le petit fragment de membrane portant les bactéries se trouve fiché à l'extrémité de la petite aiguille de tungstène dont le bout a été préalablement coupé en biseau. L'extrémité de cette petite aiguille ainsi chargée sera cassée aseptiquement et introduite dans deux ml de bouillon glucosé stérile. En même temps que le petit tube de bouillon ensemencé un bouillon identique non ensemencé, servira de témoin négatif pour évaluer la culture. Les deux tubes seront ensemble portés à 37°.

Nous avons opéré, soit en étuve à 37° en maintenant l'atmosphère humide, soit en les portant au bain-marie à 37°.

L'appréciation de la pousse se fait à l'oeil nu, par comparaison avec le témoin non ensemencé. Pour tout microbiologiste exercé, il est très facile d'apprécier une pousse même très légère. Qu'il y ait pousse ou non, le premier prélèvement sera fait sous une hotte après stérilisation de son atmosphère par les rayons Ultra-Violet. Le but de ce premier prélèvement sera avant tout de conserver une partie aliquote du bouillon ensemencé et étuvé. On introduit donc une fraction des deux ml ensemencés et étuvés dans une ampoule stérile qui est scellée immédiatement, puis conservée au frigidaire à + 4°. Cette petite ampoule est considérée comme un témoin de pousse avec la possibilité de le consulter le cas échéant Ce n'est qu'après avoir stocké l'ampoule à basse température que l'on pourra procéder aux examens bactériologiques habituels.

En premier lieu : Un examen optique en contraste de phase au grossissement suivant : X 125, X 250, X 500 à sec. Si besoin est, on peut également faire un examen en contraste de phase mais à l'immersion on obtient alors un grossissement de : X 1250. Dans le cas où l'examen est positif ou même douteux, il sera alors procédé aux colorations habituelles : Bleu de méthylène, Gram. En fonction des résultats obtenus on procède alors aux repiquages du petit tube de bouillon en milieu liquide et en milieu solide. Le travail se fait toujours sous la hotte après stérilisation de son atmosphère par rayons Ultra-Violets.

D - METHODES DE STERILISATION UTILISEES

Outre les méthodes de stérilisation bactériologiques habituelles utilisées pour la bactériologie proprement dite, toutes les pièces des cellules et des sandwichs ont nécessité une stérilisation correcte.

Trop fragile pour supporter l'autoclave ou l'étuve à 180° nous avons soumis notre matériel à l'action des rayons ultra-violet. Nous avons commencé par stériliser l'at-

mosphère pendant environ une heure, puis nous avons introduit toutes les pièces de la cellule et du sandwich dans des boites de pétri stériles que nous avons placées directement sous les lampes "G.E. germicidal Lamps". Posant à côté d'elles le couvercle correspondant. Nous avons laissé agir les rayons U.V. pendant une heure. Les boites refermées sous la hotte contiennent un matériel prêt à l'emploi.

Cette méthode de stérilisation du matériel utilisé en microscopie électronique nous a donné entière satisfaction.

T E M O I N S

Aucune expérimentation n'est valable si elle n'est entourée de ses témoins convenablement choisis. Nous allons donc examiner maintenant les témoins dont nous avons entouré toute notre expérimentation.

Il s'agit de trois grands groupes de témoins.

1) Une série de témoins "morphologique"

2) Une série de témoins "vide électronique"

Ici les germes sont placés dans les conditions normales d'un examen électronique.

3) Une série de témoins "cellule".

Ici les germes sont placés dans nos conditions d'experimentation, "cellule" ou "sandwich".

1) TEMOINS MORPHOLOGIQUE

Nos conditions de travail étant différentes de la microscopie de routine, afin de préciser les repères morphologiques indispensables, nous avons fait plusieurs séries de clichés en microscopie classique. Les images dites "pré-électroniques" sont celles du germe examiné avant son passage en "cellule" ou en "sandwich" au microscope électronique. Les images "post-électroniques" sont celles du même germe étudié après le repiquage qui suit un examen électronique en "cellule" ou en "sandwich". Nous avons obtenu toutes ces images en utilisant les techniques précitées : dépôt avec ou sans ombrage et pseudo-répliques de carbone.

Pour toutes ces microphotographies fixant la morphologie des germes nous avons utilisé l'ELMISKOP SIEMENS. Les conditions d'expérimentation fixées une fois pour toutes sont les suivantes :

Tension : 80 Kv
Débit : 7 µ A.
Tension du filament : 2 v 7.

Diaphragme condenseur : 200 µ.
Diaphragme objectif : 50 µ.

Tous les clichés ont été faits sur plaques Ilford. Le grandissement direct a également été fixé une fois pour toutes à X. 12. 000.

Ces conditions d'étude des germes avant et après leur passage en "cellule" ou en "sandwich" seront sous entendues chaque fois que nous de micrographies à l'ELMISKOP SIEMENS.

2) TEMOINS "VIDE ELECTRONIQUE"

Pour la plupart des germes étudiés, nous avons fait ce témoin "vide électronique". Voici son principe : le germe est placé dans les conditions normales d'expérience. Il faut entendre par là que le dépôt est fait sur une membrane tendue au-dessus du pertuis du diaphragme porte-objet. Ce dernier est introduit tel quel dans le microscope électronique, puis on procède à un examen normal de l'échantillon dans les conditions habituelles. Ensuite en prenant toutes les précautions nécessaires pour travailler asseptiquement, on effectue un prélèvement et on ensemence dans deux ml de bouillon glucosé.

Nous avons mis en évidence pour des spores et des bacilles l'effet létal du "vide électronique".

A - *Germe sporulé : BACILLUS SUBTILIS A.T.C.C. 6633*

Un examen électronique classique dans les conditions que nous venons de définir, les spores étant exposées au "vide électronique" a donné lieu à un prélèvement suivi d'ensemencement en bouillon glucosé, mis a incuber à 37° au temps 0 h. La culture stérile au deuxième jour, était encore stérile au neuvième jour. Les spores de Bacillus Subtilis n'ont pas pu se reproduire après leur exposition au "vide électronique".

B - *Germe non sporulé : ESCHERICHIA COLI.*

Le même examen fut fait en utilisant un bacille. L'Escherichia coli exposé au "vide électronique" a donné

lieu à un prélèvement suivi d'ensemencement en bouillon glucosé puis mis à incuber à 37° au temps 0 h. La culture stérile au deuxième jour était encore stérile au neuvième jour. Elle était toujours stérile au vingtième jour. Les bacilles, tout comme les spores n'ont pas supporté l'action du "vide électronique".

3) TEMOINS "CELLULE" et "SANDWICH"

Nous rappelons que dans cette série d'expériences "témoin" les germes à étudier sont placés dans nos conditions expérimentales.

A - *TEMOINS "CELLULE"*

La cellule préparée dans les conditions mêmes déterminées pour un examen électronique au Microscope Electronique fonctionnant sous très Haute Tension, sera gardée à l'abri de toutes souillures à température ambiante, pendant un temps correspondant à un examen électronique (dans le cas présent nous avons gardé cette cellule dans une boite de pétri stérile pendant une heure). Ce laps de temps écoulé nous avons procédé au prélèvement, ensemencé ce dernier dans du bouillon glucosé et porté celui-ci, avec son témoin non ensemencé, à 37°.

a) *Germe sporulé : BACILLUS SUBTILIS A.T.C.C. 6633*

L'inoculum ensemencé en bouillon glucosé au temps 0 h. a donné après incubation à 37° en quatorze heures un bouillon limpide avec un très léger dépot. En seize heures, un bouillon trouble, avec un début de formation de voile. En vingt heures, le bouillon présente un trouble net et des bacilles type subtilis mobiles.

b) *Germe non sporulé : CORYNEBACTERIAE DIHHTERIAE type MITIS*

L'inoculum ensemencé en bouillon glucosé au temps 0 h. a donné après incubation à 37 en deux jours un bouillon à peine trouble et quelques bacilles typiques. Un repiquage sur gélose au sang de ce bouillon donne en vingt heu-

res de petites colonies grisâtres de CORYNEBACTERIAE DIPHTERIAE.

L'ensemble de ces résultats montre que le germe déposé vivant sur la membrane, prélevé ensuite convenablement a donné des cultures bactériennes faciles. L'inoculum étant léger, la vitesse et la quantité de la culture bactérienne obtenue sont quelque peu réduites. Il ne faut pas perdre de vue que nous sommes dans des conditions particulières puisque l'inoculum ensemencé contient au mieux quelques dizaines de bactéries. Notre étude de témoins de manipulation et séjour dans la cellule de M.M. Gaston DUPOUY, Frantz PERRIER & Louis DURRIEU (3) montre que les bactéries restent vivantes après leur séjour dans la cellule d'observation sous forme sporulée et sous forme bacillaire.

B - *TEMOIN "SANDWICH"*

Nous avons opéré sur la forme sporulée de Bacillus Subtilis. Nous avons préparé un "sandwich" avec le germe choisi, nous l'avons laissé à la température ambiante environ une heure, temps correspondant à celui que l'on passa en faisant l'examen correspondant. Pendant ce temps nous avons pris toutes les précautions indispensables pour éviter toutes souillures en conservant le "sandwich" dans une boîte de pétri stérile.

Ce temps écoulé, nous avons effectué le prélèvement par piqûre, ensemencé un petit tube de bouillon glucosé et l'avons porté à 37° en même temps qu'un témoin non ensemencé. Après quatorze heures d'incubation seulement, notre bouillon glucosé présentait déjà un trouble net ainsi qu'un léger dépôt grumeleux dans le fond. Nous avons cependant attendu vingt-trois heures pour repiquer ce bouillon dans une boîte de gélose au sang. En vingt-quatre heures sur cette boîte nous avons obtenu des colonies isolées, typiques hémolytiques de : Subtilis A.T.C.C. 6633.

Nous sommes assurés que dans la cellule les bactéries restent vivantes sous leur forme sporulée et bacillaire, qu'elles restent vivantes sous leur forme sporulée dans un "sandwich". Mais nous n'avons pas étudié la forme bacillaire dans cette deuxième condition.

SURVIE DES BACTERIES ET DES SPORES

ETUDE FAITE A L'AIDE D'UN MICROSCOPE ELECTRONIQUE FONCTIONNANT SOUS TRES HAUTE TENSION (750Kv, 1000Kv)

En utilisant le porte-objet spécial défini comme une "cellule" dans le compte rendu fait à l'Académie des Sciences par M.M. Gaston DUPOUY, Frantz PIERRIER, et Louis DURRIEU (3), nous avons étudié la survie des bactéries à la sortie du Microscope Electronique à Haute Tension (M.E.H.T.)

Nous rapportons ici deux séries d'expériences analogues. Nous avons étudié sensiblement les mêmes germes sous deux tensions différentes. La Première série d'examens est effectuée à la fin de l'année 1960, sous une tension de 750 Kv : La deuxième série d'examens s'étale sur l'année 1961 et la tension sous laquelle nous avons opéré était de : 1000Kv. Dans chaque série nos études ont porté sur des germes sporulés et sur des germes à l'état bacillaire.

Nous allons considérer successivement ces deux séries expérimentales.

1°) ENSEMBLE DES EXAMENS EFFECTUES AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE FONCTIONNANT SOUS UNE TENSION DE 750 Kv.

Dans le compte rendu à l'Académie des Sciences précité (3) M. Gaston DUPOUY et ses collaborateurs mentionnent que des travaux ont été faits et que nous avons opéré sur : CORYNEBACTERIUM DIPHTERIAE et BACILLUS SUBTILIS. Notre but est d'exposer ici en détails quelle fut l'évolution post-électronique des spores et des bacilles irradiés.

A - *GERME SPORULE*
BACILLUS SUBTILIS A.T.C.C. 6633

Les spores sont issues d'une culture en gélose ordinaire incubée quarante huit heures.

Dans les conditions définies une cellule montée, examinée prélevée a donné un bouillon glucosé ensemencé avec les spores irradiées, nous allons suivre l'évolution de ce bouillon dans le tableau I . Il nous suffira ensuite d'un seul coup d'oeil pour conclure.

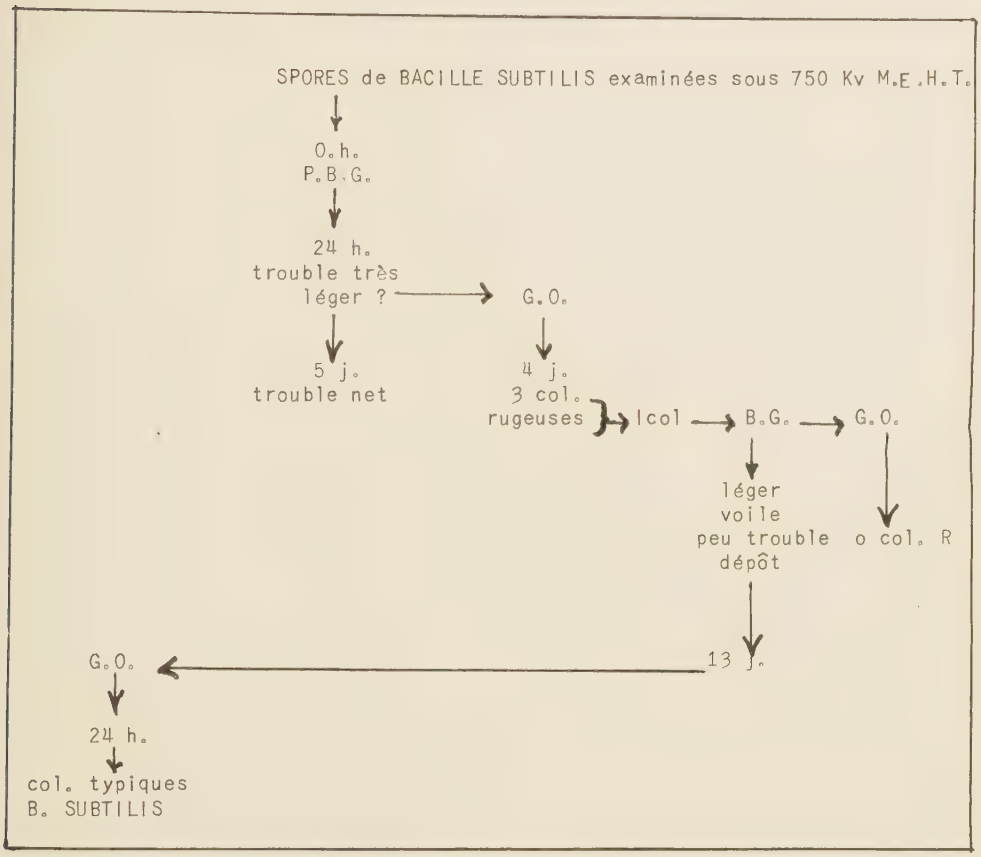

TABLEAU I

L'examen de ce tableau nous montre que, rapidement, en cinq jours nous avons obtenu une culture post-électronique à partir des spores de bacilles subtilis ayant subi un examen électronique. Examen qui se fait sous une tension de 750 Kv. Par l'intermédiaire d'un deuxième bouillon qui donne toutes facilité de sporuler en fonction du temps, on retrouve au passage suivant en milieu solide le germe avec un aspect morphologique typique et normal.

B - *GERME SPORULE*
BACILLUS ANTHRACOMORPHE

Nous avions l'intention de faire un essai en utilisant une souche de Mycobacterium "paratuberculeux". Dans la collection qui nous était proposée notre choix s'est porté sur un tube parmis les autres. Ce tube présentait une culture qui semblait assez abondante. Sur un premier examen notre surprise fut grande de voir en lieu et place du bacille de la "fléole" que stipulait l'étiquette, des spores. Notre tube était souillé par un Bacillus anthracomorphe". Les images étaient si satisfaisantes que nous avons décidé de poursuivre l'expérience en utilisant la souillure.

C'est ainsi que nous avons examiné des spores de Bacillus anthracomorphe en cellule et fait un prélèvement qui fut suivi de cultures post-électroniques. L'évolution de ces cultures se trouve résumé dans le tableau 2.

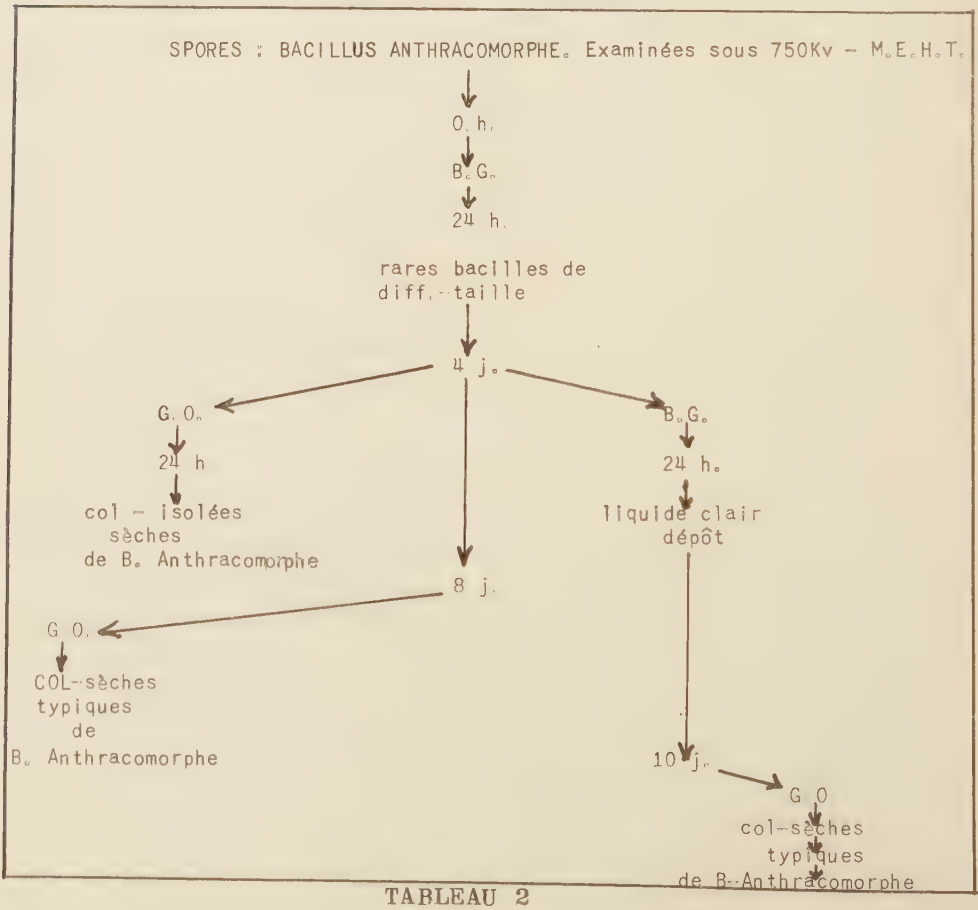

TABLEAU 2

Nous savions déjà que les spores de bacilles subtilis supportaient l'examen électronique sous une tension de 750 Kv et que rapidement la culture post-électronique revenait identique à elle-même. De l'examen du tableau 2 il ressort une confirmation de cette assertion. Les spores à la sortie du microscope électronique, placées dans un milieu neuf ont pu en se reproduisant donner une culture post-électronique rapidement semblable à la souche d'origine.

A - *GERME NON-SPORULE :*
CORYNEBACTERIUM DIPHTERIAE MITIS

Cette souche nous fut aimablement fournie par le Laboratoire de bactériologie de l'hopital PURPAN à TOULOUSE (Professeur ANDRIEU) où elle avait été isolée au cours d'une angine diphtérique (n° 010.194). Nous avons fait la suspension à partir d'une culture sur gélose ordinaire incubée 24 h à 37°.

Le processus des manipulations toujours identique a lui-même comprend les temps déjà décrits. Le dépôt est effectué sur les fenêtres choisies à l'aide d'une pipette pasteur, puis la cellule est montée (ceci ayant déjà fait l'objet d'un exposé nous n'y reviendrons pas). La cellule ainsi montée est introduite dans le M.E.H.T., puis on procède à l'observation et la photographie des bactéries. La cellule retirée de l'appareil, on procède au prélèvement selon la technique indiquée précédemment (1). Nous prendrons en considération dans nos études la cellule au moment du prélèvement pour culture. Le temps O.h. des cultures post-électroniques étant noté comme celui où le bouillon glucosé (B.G.) est ensemencé et mis à incuber à 37°.

Pour le bacille diphtérique nous avons examiné de la sorte trois cellules : (C.1, C.2, C.3). Ces trois cellules nous donnèrent au temps zéro trois bouillons glucosé (B.G.). Au bout d'un laps de temps de 24 h. l'examen de chacun de ces trois bouillons nous montre en microscopie optique des éléments à morphologie bacillaires. Ils sont très différents les uns des autres, nous avons pu voir de rares éléments bacillaires longs alors qu'en majorité le petit nombre de germes présents sont des éléments de petite taille. Nous avons alors fait des repiquages pour chaque

(B.G.) provenant des cellules examinées. Sur gélose de veillon et bouillon glucosé pour C 1. Sur serum coagulé et Bouillon glucosé pour C_2 et C_3.

Pour la série issue de C1 nous avons obtenu en quarante huit heures un léger trouble dans le bouillon glucosé seul. Nous avons repiqué ce bouillon sur gélose ordinaire : cette dernière en quarante huit heures nous donne deux types de colonies. Un staphylocoque, souillure que nous avons éliminée et de toutes petites colonies de germes cocciformes difficile à isoler et perdus au cours des repiquages ultérieurs.

Pour la série issue de C2 le repiquage sur serum coagulé était négatif.

Par contre le bouillon glucosé stocké dix jours au refrigérateur à plus 4°, a donné au repiquant le vingt sixième jour sur gélose au sang une pousse en quarante huit heures. Au point d'ensemencement la culture se traduit par l'apparition de quelques colonies, petites, grisâtres, transparentes. Repiquées sur gélose au sang nous avons obtenu en quarante huit heures de petites colonies grisâtres, hémolytiques β gardant la coloration de petits bacilles en navette, gram +.

Cette culture remise au laboratoire de Bactériologie de la Faculté de Médecine de Toulouse fait l'objet d'une étude bactériologique poussée (Pr L. ENJALBERT et Dr L. LAPCHINE).

Pour la série issue de C3, les cultures post électroniques observées pendant une semaine seulement au Laboratoire de Bactériologie du CHR de Purpan sont restées stériles pendant ce temps d'observation que nous savons maintenant insuffisant.

Nous allons résumer cet exposé dans les tableaux A et B. De leur examen nous pourrons tirer les conclusions qui s'imposent.

CORYNEBACTERIUM DIPHTERIAE (Mites) Examiné sans 750 Kv M.E.H.T.

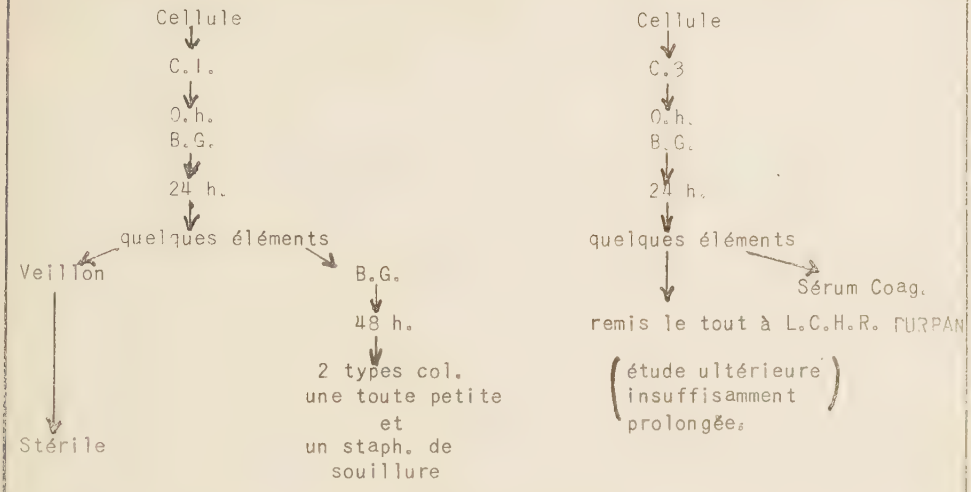

TABLEAU 3

CORYNEBACTERIUM DIPHTERIAE (Mites) Examiné sans 750 Kv M.E.H T

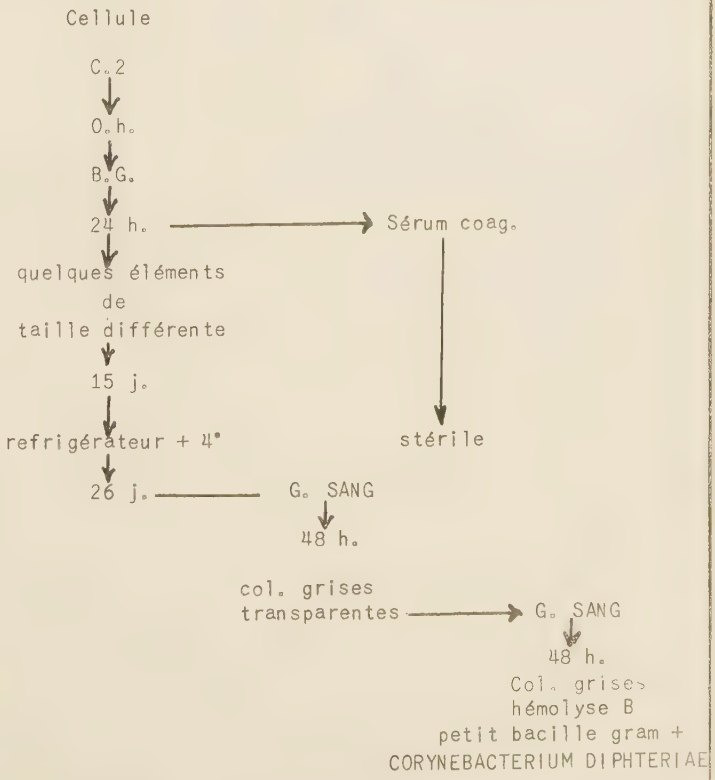

TABLEAU 4

Après l'examen de ces deux tableaux, nous pouvons donc affirmer que les bactéries ont supporté les radiations dues à l'examen électronique sous une tension de 750 Kv. Ensemencées sur milieu neuf elles se sont reproduites deux fois sur trois en donnant naissance à une culture post-électronique. La première culture post-électronique sur milieu solide se présente morphologiquement différemment de la souche initiale pré-électronique. Entrevue en C1 perdue en C3 par un transport trop rapide mise en évidence en C2 la culture post-post-électronique présenté dès le premier milieu solide un aspect morphologique distinct. Elle est essentiellement formée de petits bacilles courts en navette presque cocobacillaire qui reprennent très lentement leur aspect bacillaire d'origine et montrent après douze mois d'étude un pouvoir toxigène différent de la souche d'origine.

Toutes ces questions sont actuellement l'objet d'études bactériologiques précises et longues aussi bien in vitro qu'in vivo, de façon a affirmer la similitude ou souligner les différences entre les cultures du Corynebacterium Diphteriae avant et après l'examen en microscopie électronique à 750 Kv.

RESUME - L'irradiation électronique dans un microscope fonctionnant sous une tension de 750 Kv ne tue pas les germes. Ceci est vérifié pour des spores de Bacillus anthracomorphe et pour une souche de Corynébacterium Diphteriae. L'irradiation électronique dans ces conditions n'a pas d'effet létal, après une observation prolongée au minimum quinze minutes et une heure au maximum.

II - ENSEMBLE DES EXAMENS EFFECTUES AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE FONCTIONNANT SOUS UNE TENSION DE 1.000 Kv.

Nous avons montré que l'irradiation électronique n'était pas létale pour une tension de 750 Kv. Nous allons poursuivre nos études d'une façon parallèle mais cette fois sous une tension de 1.000 KV les études se feront avec des germes analogues.

A - GERME SPORULE
BACILLUS SUBTILIS A.T.C.C. 6633.

Nous avons utilisé pour le dépôt une culture de dix jours ayant sporulé à l'étuve à 37°. La cellule faite montée, examinée, photographiée, on fit normalement le prélèvement, puis ensemencé en bouillon glucosé. Nous allons étudier sur le tableau 5 son évolution (page 25).

Il est à remarquer que nous avons intentionnellement allongé les temps de culture. Ceci permet aux éléments vivants de se multiplier en toute quiétude à l'abri de toutes souillures et nous donne de bons résultats. Dans le cas présent une souche post-électronique est mise en évidence en un mois. Elle présente avec la souche pré-électronique deux caractères distinctifs qui semblent s'atténuer par repiquages.

Premier caractère distinctif : Les bacilles sont de tailles différentes, courts et moyens. Il sera nécessaire d'étudier ces caractères en fonction du temps afin de savoir s'ils sont stables ou non.

Deuxième caractère distinctif : La pousse en bouillon est différente, alors que la souche pré-électronique donnait une pousse essentiellement aérobie, bouillon clair et voile épais, la souche post-électronique est aéro-anaérobie, bouillon uniformément trouble, voile très léger. Il nous faudra également en fonction du temps étudier la stabilité de ce caractère.

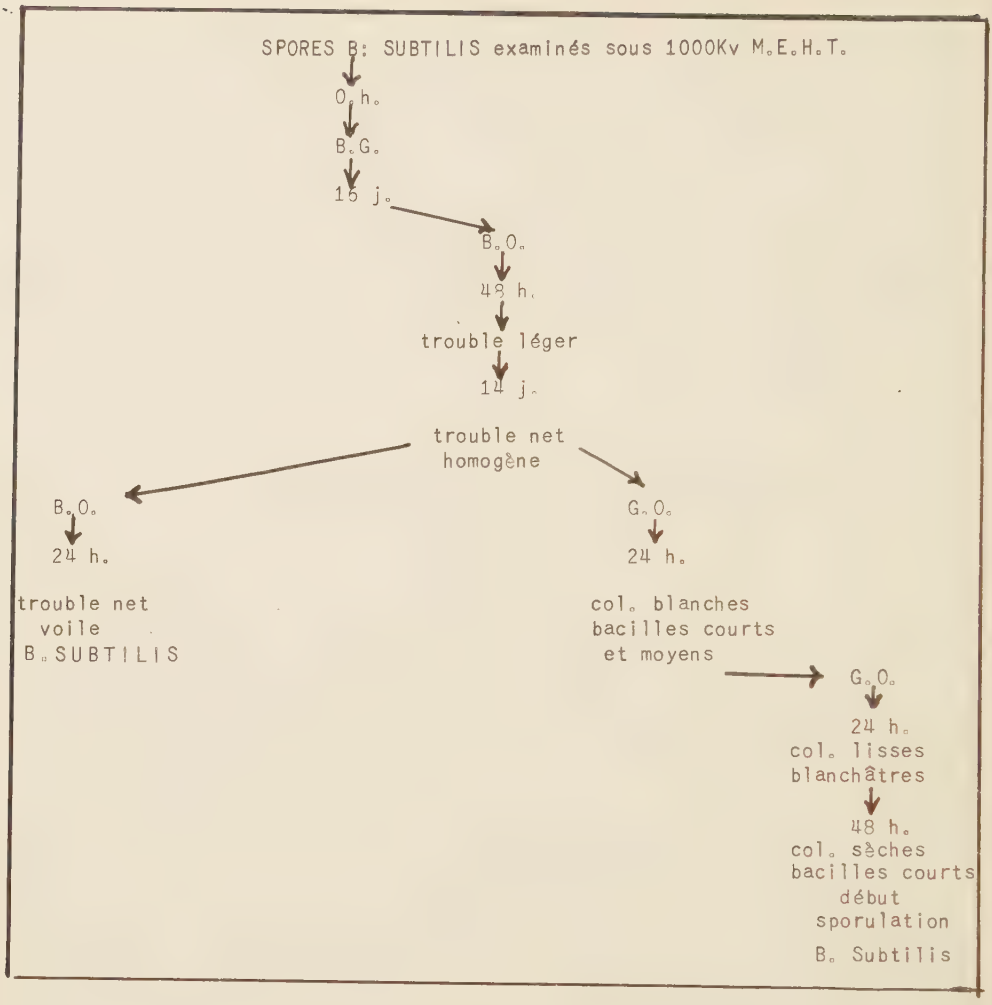

TABLEAU 5

B - *GERME NON SPORULE*
Bacillus subtilis A.T.C.C. 6633.

Nous avons montré que les spores survivaient à l'examen électronique. Nous allons essayer maintenant de démontrer qu'il en est de même pour le bacille lui-même.

Nous avons utilisé l'artifice suivant pour obtenir une culture de bacilles jeunes en pleine vitalité. Sur une boîte de pétri contenant de la gélose ordinaire, nous avons ajouté dix ml d'eau distillée stérile. Nous avons en-

semencé le tout en son centre avec une goutte de suspension de spores du germe à étudier. En 24 h. nous avons obtenu dans l'eau une moisson abondante de bacilles en conditions parfaite. Une goutte prélevée avec la micro-anse fut utilisée pour le dépôt. Pour obtenir une préparation parfaitement propre nous avons lavé le dépôt avec une goutte d'eau distillée stérile. Nous avons alors procédé au montage puis à l'examen de la cellule. Les clichés ayant été pris la cellule nous fut rendue pour le prélèvement. Le bouillon glucosé ensemencé nous marque le temps zéro de la culture post-électronique. Nous allons la suivre en étudiant le tableau 6.

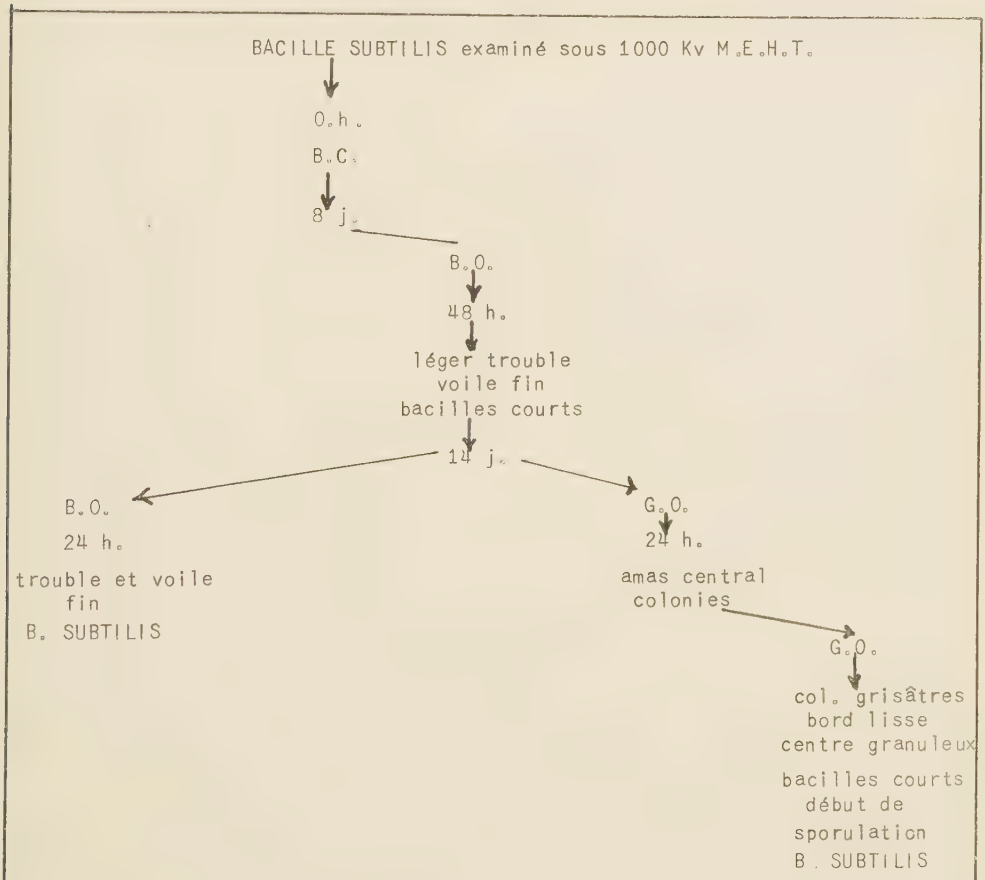

TABLEAU 6

De l'examen du tableau 6, nous pouvons conclure à la survie des bacilles après un examen électronique fait sous une tension de 1.000 Kv. Ici également nous ferons les mêmes remarques que précédemment. La culture post-électroni-

que se présente comme ayant acquis un caractère aéro-anaérobie qu'elle ne présentaient pas auparavant en milieu liquide. En milieu solide les colonies très jeunes sont lisses, elles prennent rapidement un aspect sec et rugueux. La morphologie des bacilles différe également, dans l'ensemble les bacilles sont courts. La sporulation sur gélose est presque totale en quarante huit heures. Des études plus poussées, suivies dans le temps pourront seulement nous dire si ce caractère est stable ou transitoire.

C - *GERME NON SPORULE*

Corynebacterium diphteriae P.W. 8

Cette souche internationale bien connue, fut ensemencée en gélose ordinaire. L'incubation en fut poursuivie pendant dix jours à 37°. (Après lyophilisation la pousse étant lente) Le tube fut alors stocké à + 4° au frigidaire deux jours avant de faire la suspension. Cette suspension fut utilisée pour le dépôt sur une des fenêtres de la cellule que l'on a monté puis examiné et photographié. La suspension servi également pour préparer deux grilles porte-objet, une d'elles fut ombrée au chrome selon la technique habituelle, réalisant un ombrage d'une épaisseur de 6 Å.

Ces deux grilles constituent des témoins morphologiques du bacille.

Nous avons à la suite d'un examen de ces grilles au microscope électronique ELMISKOP SIEMENS pris des clichés correspondant au bacille diphtérique ombré au chrome et des clichés correspondent au même bacille sans ombrage. Selon la technique des pseudo-répliques nous avons fait également des clichés.

Après l'examen au M.E.H.T. pendant lequel des micrographies furent prises, nous avons effectué le prélèvement qui nous a conduit à ensemencer un bouillon glucosé. L'évolution des cultures post-électronique à partir de ce bouillon est résumée dans les tableaux 7 et 8.

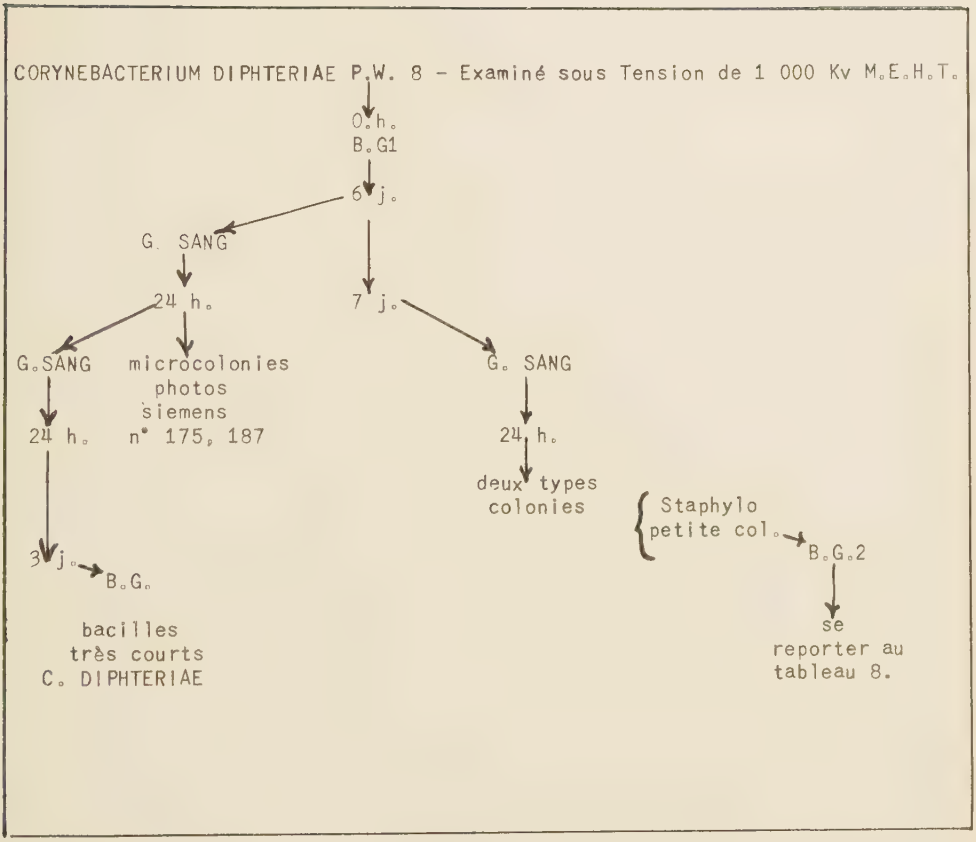
CORYNEBACTERIUM DIPHTERIAE P.W. 8 - Examiné sous Tension de 1 000 Kv M.E.H.T.
0.h.
B.G1
6 j.
G. SANG
24 h.
7 j.
G.SANG
microcolonies
photos
siemens
n° 175, 187
G. SANG
24 h.
24 h.
24 h.
deux types
colonies
Staphylo
petite col.
B.G.2
3 j.
B.G.
se
reporter au
tableau 8.
bacilles
très courts
C. DIPHTERIAE

TABLEAU 7

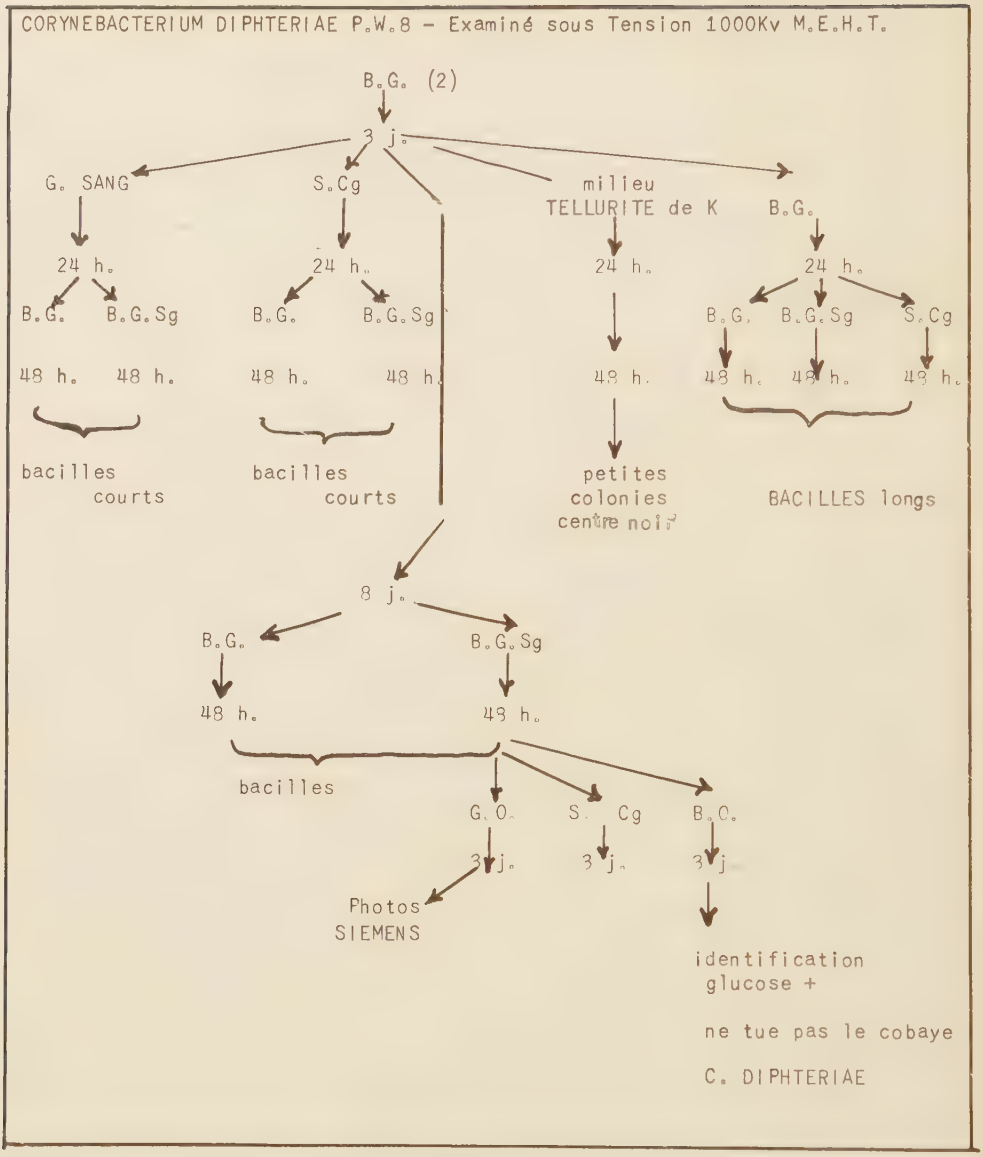
CORYNEBACTERIUM DIPHTERIAE P.W.8 - Examiné sous Tension 1000Kv M.E.H.T.
B.G. (2)
3 j.
G. SANG
S.Cg
milieu TELLURITE de K
B.G.
24 h.
24 h.
24 h.
24 h.
B.G.
B.G.Sg
B.G.
B.G.Sg
B.G.
B.G.Sg
S.Cg
48 h.
48 h.
48 h.
48 h.
48 h.
48 h.
48 h.
48 h.
bacilles courts
bacilles courts
petites colonies centre noir
BACILLES longs
8 j.
B.G.
B.G.Sg
48 h.
48 h.
bacilles
G.O.
S. Cg
B.C.
3 j.
3 j.
3 j.
Photos SIEMENS
identification glucose +
ne tue pas le cobaye
C. DIPHTERIAE

TABLEAU 8

Après l'examen des cultures post-électronique issues du bacille diphtérique irradié sous une tension de 1000 Kv, nous pouvons affirmer que en douze jours, il a été possible de mettre en évidence la culture post-électronique. Notons que la culture semble récupérer plus vite quand les passages se font principalement en milieu liquide. Nous avons en effet, par passages successifs en bouillon, obtenu des formes bacillaires plus longues que celles obtenues par l'intermédiaire de milieu solide. Dans ce cas les bacilles avaient une forme cocobacillaire.

Nous avons testé cette souche post-électronique en deux temps. Un temps bactériologique et un temps électronique en vue de son identification.

L'étude bactériologique faite au Laboratoire de la Faculté de Médecine de Toulouse (Professeur L. ENJALBERT et Dr L. LAPCHINE) a donné les caractères d'identification suivants : le glucose fermente en 48 heures, pour le saccharose : pas de fermentation. Un cobaye inoculé avec un bouillon de culture restait toujours vivant après dix jours. Cette souche P.W 8 dont le pouvoir pathogène est bien connu semble donc avoir perdu cette propriété. Des études plus complètes en cours dans le laboratoire nous renseignerons sur ce sujet.

L'étude électronique pour l'identification morphologique de la souche post-électronique fut faite parallèlement à celle que nous avons faite pour la souche pré-électronique. Se repporter aux clichés correspondants. n° I, II, III et IV

En conclusion de ce chapitre, une comparaison s'impose entre les deux séries de micrographies pré et post-électronique. Les deux cultures se présentent sous un aspect très différent. En effet la culture pré-électronique se présente comme formée principalement de bacilles d'environ 2 µ, assez épais et granuleux (de grosses granulations). Au contraire la culture post-électronique se présente comme formée en majorité de petits bacilles ayant généralement moins d'un µ. Ces bacilles sont courts, ramassés, granuleux. Ces granulations ne sont pas homogènes. Certains bacilles semblent bourrés de granulations, alors que d'autres n'en présentent qu'une seule mais beaucoup plus grosse.

RESUME - L'irradiation électronique dans un microscope fonctionnant sous une tension de 750 Kv et sous une tension de 1000 Kv ne tue pas les germes. Ceci est vérifié pour des spores, de Bacillus Anthracomorphes et pour une souche de Corynébacterium Diphteriae. L'irradiation électronique dans ces conditions n'a pas d'effet létal après une observation prolongée au minimum quinze minutes et au maximum soixante minutes.

SURVIE DES BACTERIES ET DE SPORES

ETUDES FAITES A L'AIDE DE L'APPAREIL "ELMISKOP SIEMENS" FONCTIONNANT SOUS UNE TENSION DE 80 Kv

Dans les conditions d'examen fixées auparavant pour le microscope ELMISKOP SIEMENS nous avons étudié la survie des bactéries. Cette étude est menée parallélement à celle qui a été faite pour un microscope électronique fonctionnant sous très haute tension. Pour l'examen des bactéries nous avons utilisé la technique du sandwich, technique que nous avons décrite dans un chapitre spécial

Nos essais ont porté sur un germe sporulé et sur des germes à l'état bacillaire. Nous allons examiner par le détail les expériences qui ont été faites, les résultats obtenus, nous pourrons ensuite par l'examen de ces résultats en tirer la conclusion qui s'impose.

I - ETUDE D'UN GERME SPORULE : Bacillus subtilis A.T.C.C. 6633.

Pour préparer le sandwich nous avons utilisé une suspension de spores dans l'eau distillée. Les spores provenaient d'une culture sur gélose ordinaire vieille de 7 jours. Avant d'utiliser cette suspension nous avons vérifié l'échantillon que nous nous proposions d'employer. L'examen pratiqué en contraste de phase nous a permis d'apprécier que la suspension était uniquement formée de spores. L'échantillon étant satisfaisant a été utilisé pour faire le dépôt, puis le "sandwich".

Nous avons effectué un examen électronique. Cet examen terminé nous avons effectué le prélèvement et ensemencé celui-ci dans un bouillon glucosé B.G. Le temps ZERO (0 h.) étant noté au moment ou le petit tube ensemencé est placé à 37°. Après trois jours d'incubation, nous avons pu mettre en évidence par un examen en contraste de phase quel-

ques rares bacilles peu mobiles gardant la coloration de Gram. Nous avons aussitot ensemencé un bouillon glucosé (B.G.) celui-ci en 48 h. nous a donné une culture évidente à l'oeil nu : liquide légèrement trouble, fragments de dépôt en collerette sur la parois du tube à la limite supérieure du bouillon En contraste de phase une goutte prélevée nous a montré des bacilles mobiles en quantité notable. Sur le meme échantillon une coloration de Gram nous montre les memes bacilles Gram positif faible et nous montre également un début de sporulation Nous avons cependant repris le bouillon initial (B G), après Quatre jours d'incubation. Nous avons fait un premier repiquage sur gélose ordinaire (G O) et un deuxième sur gélose au sang (G SANG). La gélose ordinaire n'a rien donné, la gélose au sang a montré en quatre jours la pousse d une colonie Ronde grasse irrégulière et sèche en quatre jours. C'est de cette colonie que nous sommes repartis Nous avons d abord émulsionné une petite portion du bord de la colonie dans un bouillon glucosé (B.G.) et à partir de ce dernier, nous avons ensemencé une gélose au sang (G SANG) et une gélose ordinaire (G O) Le tout placé à 37°. L'examen des cultures nous a donné après 24 h. d'incubation les résultats suivants

Le bouillon

Il présente un liquide trouble avec un léger dépôt. Une goutte examinée en contraste de phase nous montre les Bacillus mobiles.

La gélose ordinaire

Elle ne présente rien de visible à l'oeil nu.

La gélose au sang

Elle présente une colonie typique. Mais elle présente également beaucoup de toutes petites colonies.

Nous avons poursuivi l'incubation de ces trois cultures pendant 72 h Au bout de ce laps de temps voici comment se présentaient nos repiquages.

Le bouillon

Le bouillon avait une turbidité assez forte (fortement accusée par comparaison avec celle des 24 h.) Le

dépôt était également plus abondant. Nous avons repiqué en gélose ordinaire.

La gélose ordinaire :

Alors qu'au premier examen elle nous avait parue stérile, elle présente maintenant le long des traits d'ensemencement des colonies arrondies, irrégulières grasses. Ces colonies grasses au début de leur évolution se plissent et deviennent sèches. Elles ne sont pas toutes de la même taille. Il en est de moyennes et de plus petites.

La gélose au sang :

La colonie typique est toujours identique à elle-même. Les autres ont évolué. Elles forment maintenant des petites colonies sèches alors qu'à la première observation elles étaient grasses.

Nous avons alors constaté combien étaient différents entre eux les repiquages, principalement ceux issus de milieux solides. Il semble que le germe récupère plus vite, son aspect d'origine en milieu liquide. Nous avons alors repris le dernier bouillon et fait un étalement sur gélose ordinaire dans une boite de pétri. En 24 h. nous avons obtenu à partir de ce dernier repiquage des colonies isolées : sèches, typiques de Bacillus. Ces colonies présentaient tous les caractères de pousse de la souche d'origine, avant son irradiation sous le faisceau électronique de notre microscope.

Voici résumé dans le Tableau N° 9 les faits précédents.

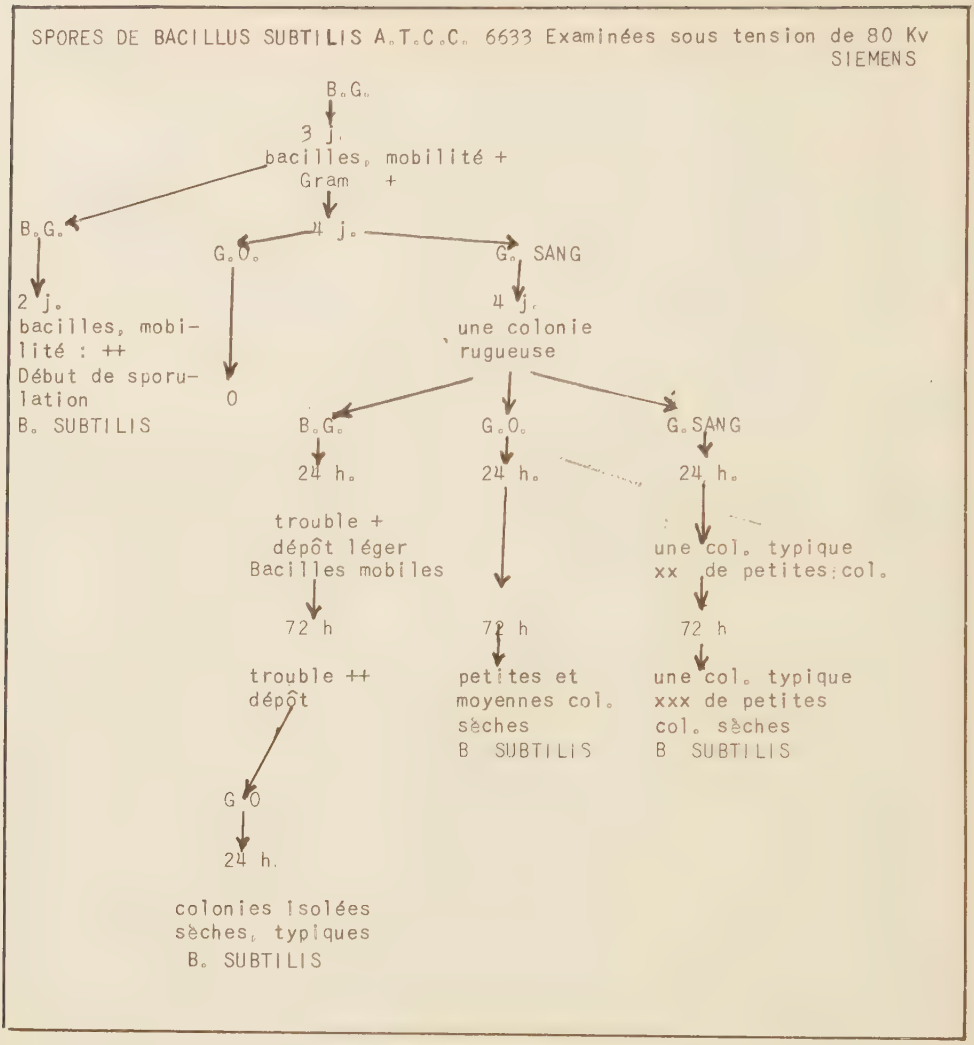

TABLEAU N° 9

Que conclure à la suite de cet examen ?

Nous pouvons déjà constater que grâce à la technique du "sandwich" mise au point au laboratoire d'Optique Electronique du C.N.R.S., nous avons pu, après un examen électronique, reprendre des spores de Bacillus et les faire repousser Celles-ci après une période d'incubation (cinq jours) ont donné une souche post-électronique identique à la souche initiale.

Un deuxième point est évident : Les germes irradiés, sous forme de spores récupèrent plus facilement et plus rapidement leur forme bacillaire en milieu liquide

qu'en milieu solide. Dans le cas présent cinq jours suffisent pour le milieu liquide alors que l'intermédiaire d'un seul milieu solide porte le délai à neuf jours.

Nous nous sommes assurés de la survie d'une souche bactérienne sous la forme sporulée. Nous avons ensuite orientés nos recherches vers l'examen de bactéries sous la forme bacillaire.

II - ETUDES DE GERMES NON SPORULES

Dans ce cas nous avons étudié cinq germes différents. Le processus suivi ayant été expliqué en détails dans l'exposé précédent sur le bacille subtilis nous nous bornerons seulement à résumer nos expériences dans un tableau commenté.

Les souches étudiées par nos soins furent : ESCHERICHIA COLI, PROTEUS MIRABILIS, CORYNEBACTERIAE DIPHTERIA MITIS, CORYNEBACTERIAE DIPHTERIAE P.W.8, et MYCOBACTERIUM PHLEI.

A - *ESCHERICHIA COLI* :

Le tableau N° 10 résume nos expériences sur l'évolution des cultures post-électronique obtenues à partir de deux préparations en "Sandwich". S_1 et S_2.

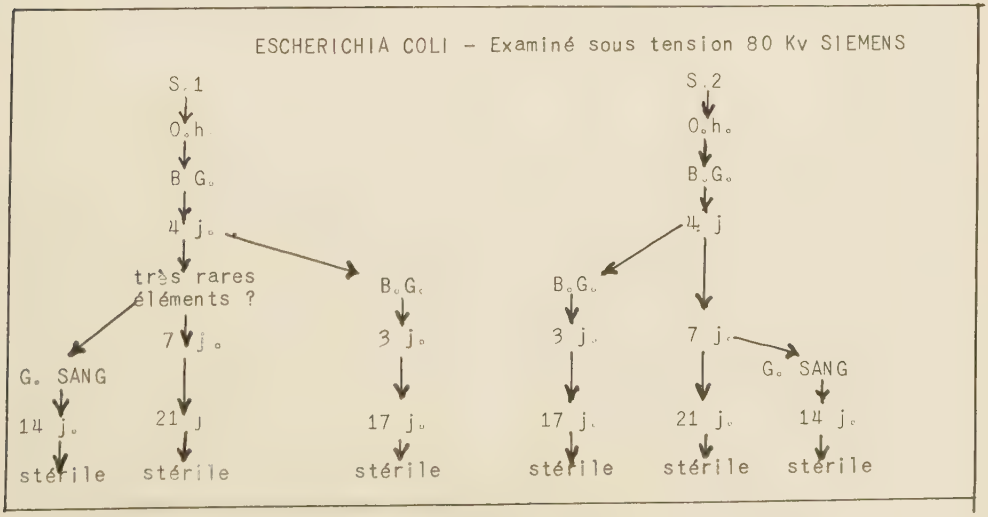

TABLEAU N° 10

Il ressort de l'étude de ce tableau que dans nos conditions d'expériences l'Escherichia Coli n'a pas supporté l'action du faisceau électronique.

B - *PROTEUS MIRABILIS*

Dans ce cas encore nous avons effectué deux préparations en sandwich. Pour le premier (S.1) nous avons utilisé une culture de six heures, alors que pour le deuxième c'est une culture de vingt-quatre heures qui a été utilisée.

La lecture du tableau N° 11 nous renseigne sur l'évolution post-électronique, de S_1 et S_2 :

PROTEUS MIRABILIS - Examiné sous tension 80 Kv - Siemens

S_1	S_2
↓	↓
0 h	0 h
↓	↓
B G	B G
↓	↓
4 j	4 j
↓	↓
6 j.	fortement trouble ⟶ 6 j.
↓	
limpide	Cocci Gram positif STAPHYLOCOQUE Souillure Absence de Bacilles Gram.
↓	
18 j.	
STERILE	

TABLEAU N° 11

Ici un incident est intervenu : Lors d'un prélèvement nous avons une souillure qui a poussé dans un de nos tubes. Notre attention fut rapidement éveillée par une turbidité trop forte de la culture. Les cultures post-électroniques sont toujours légères dans les premiers temps. Là encore nous nous trouvons devant le fait que le proteus n'est pas capable de se reproduire après passage du microscope électronique à 80 Kv.

C - *CORYNEBACTERIUM DIPHTERIAE MITIS*

Nous avons poursuivi notre étude avec un bacille diphtérique. Ce germe nous avait été fourni obligeamment avec le Laboratoire de Bactériologie C.H.R. de Purpan à Toulouse où il avait été isolé d'une angine aigue. (N° 010.194).

Pour nos préparations en Sandwich, nous avons employé une culture de trente six heures abondante granuleuse. Le tableau N° 12 nous permet de suivre l'évolution post-électronique.

CORYNEBACTERIUM DIPHTERIAE type Mitis - Examiné sous tension de 80Kv Siemens

	O.h.		
	↓		
	B.G.		
	↓		
	3 j.		
	↓		
	limpide	G.SANG	
	↓	↓	
G. SANG	6 j.	3 j.	
↓	↓	↓	
2 j.	8 j.	5 j.	
↓	↓	↓	
4 j.	10 j.	7 j.	G. SANG
↓	↓	↓	↓
9 j.	15 j.	12 j.	5 j.
↓	↓	↓	↓
stérile	stérile	stérile	stérile

TABLEAU N° 12

Pour le Corynebacterium Diphteriae Mitis nous nous retrouvons encore dans le cas où le bacille n'a pas supporté l'action du faisceau et n'est pas capable de se reproduire après passage sous tension de 80 Kv en microscopie électronique.

D - *CORYNEBACTERIUM DIPHTERIAE P.W. 8*

Nous avons utilisé cette souche internationale en prenant une culture abondante et granuleuse de quatre jours.

Le Tableau N° 13 en résume l'évolution post-électronique.

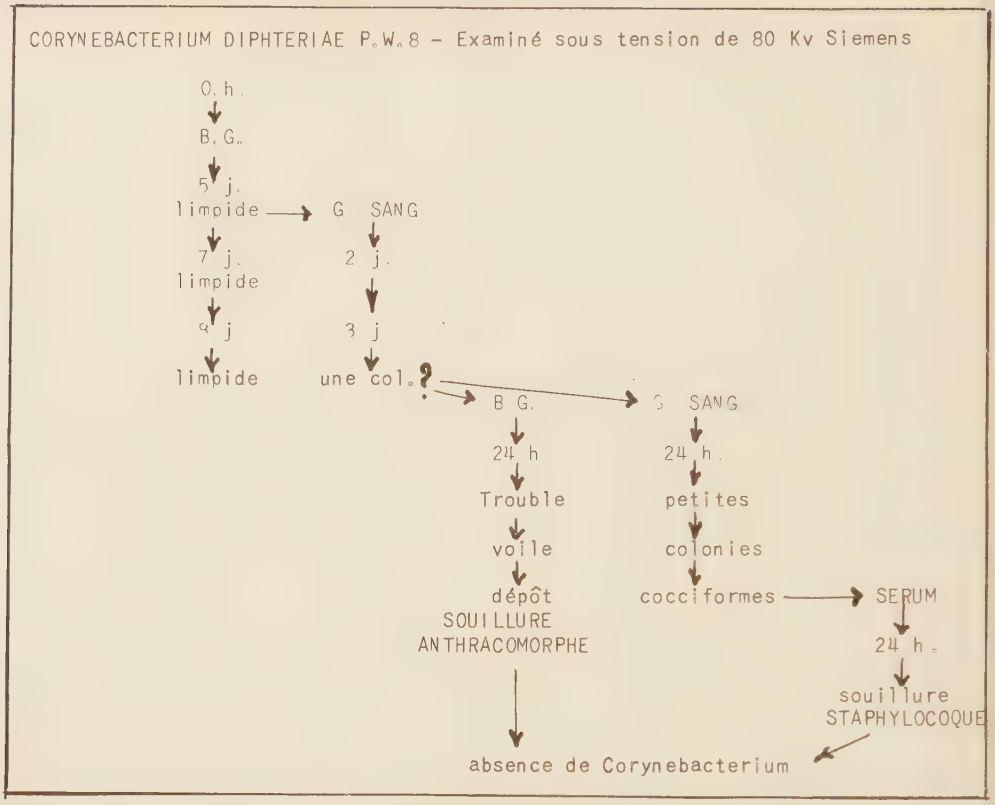

TABLEAU N° 13

Pour le bacille diphtérique P.W.8 comme pour le Mitis, nous nous retrouvons dans le cas où le bacille n'est pas après l'action du faisceau électronique capable de se reproduire. Des souillures ont gêné dans ce cas nos manipulations.

E - *MYCOBACTERIUM PHLEI*

Nous avons utilisé une culture de quatre jours de Fléole. Nous résumons dans le tableau N° 14 ce qui se rapporte à l'évolution post-électronique.

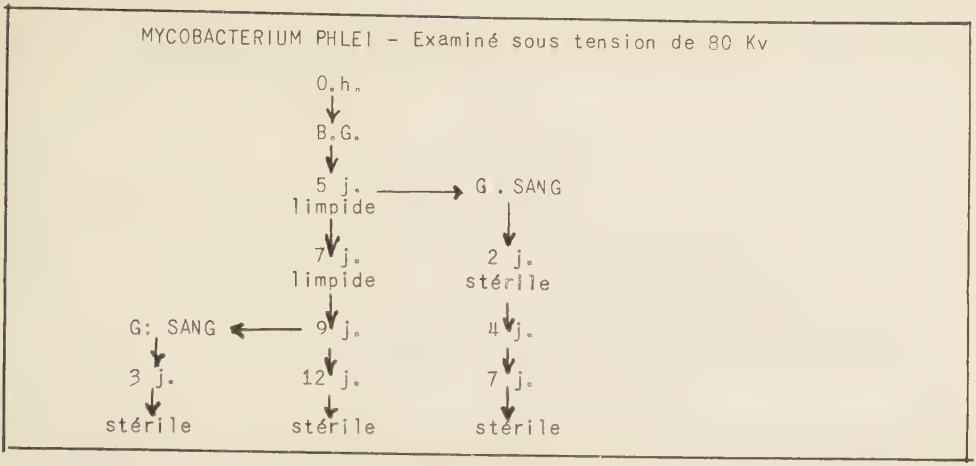

TABLEAU N° 14

Le bacille de la fléole comme tous ceux que nous avons étudiés dans ce chapitre n'a pas résisté à l'action du faisceau électronique.

RESUME - Les germes sporulés examinés en "sandwich" protégés du vide électronique ont donné des cultures post-électroniques, après un examen en microscopie électronique sous une tension de 80 Kv. Ils n'ont pas été tués par l'action du faisceau électronique. Par contre tous les germes à l'état bacillaires examinés sous cette tension et dans les mêmes conditions ont subi l'action létale du faisceau électronique et n'ont pas donné de cultures post-électroniques.

D I S C U S S I O N

Que pouvons nous affirmer en récapitulant les résultats de nos études ?

En premier lieu que "le vide électronique" tue les bactéries. En effet les témoins exposés à l'action du "vide électronique", introduits de suite dans un milieu neuf, n'ont donné que des cultures stériles. Bien que parfois nous ayons observé dans un prélèvement issu du premier bouillon glucosé de très rares éléments bacillaires, pas un seul de ces éléments n'a pu engendrer de souche vivante par la suite. Le fait bien connu était déjà noté par LEA en 1947 (9) dans son ouvrage sur "L'action des radiations sur les cellules vivantes". Il note en effet que "Une dose modérée de radiations est capable de causer la mort de la cellule, non immédiatement mais au moment ou après la division" Dernièrement W DEXTER BELLAMY (6) reprend cette notion et nous précise que "l'inactivation par les radiations veut généralement dire incapacité de continuer une croissance indéfinie. Les cellules inactivées peuvent entreprendre une ou plusieurs divisions et peuvent avoir une grande perte de leur activité enzymatique suivant immédiatement une dose létale d'irradiation Mais l'organisme ou sa progéniture ne peut se reproduire personnellement "W D BELLAMY (6) ajoute même que "Pour cette raison on pense que l'effet létal est dû à un traumatisme d'ordre génétique "Ici le mot "traumatisme" est pris dans le sens, état général créé de toute pièce par l'action d'une violence externe (le rayonnement) sur l'organisme (la bactérie). Nous n'avons jamais perdu de vue cette notion de mort à retardement au cours de toutes nos expériences. Nous avons certifié que la souche était vivante qu'après plusieurs repiquages en milieu neuf et qu'après avoir obtenu sur milieu solide des colonies isolées, et ceci d'une façon indiscutable Pour tous les examens nous avons opéré ainsi, nous assurant de la continuité de pousse des cultures "post-électroniques"

Cependant avant de conclure à la stérilité d'une culture il faut toujours admettre un assez long temps d'observation. Nous ne devons pas oublier qu'une inhibition temporaire de la division apparait être une action générale des radiations a été démontrée avec une grande variété de cellules. La durée de ce délai augmente quand la dose augmente" (9). Ce délai permet aux bactéries de récupérer lentement. Donc avant de déclarer qu'une culture est stérile il faut être sûr d'avoir dépassé largement cette période d'incubation. Lorsque nous sommes devant le cas d'inhibition permanente : la culture reste stérile.

Nous pouvons affirmer en second lieu que les électrons peu accélérés à une exception près (les spores de Bacillus Subtilis) tuent les bactéries. En effet les bactéries qui ont subi l'action du faisceau électronique (électrons et rayons X) sous une tension d'accélération de 80Kv. n'ont jamais donné de culture. S'agit-il d'une inhibition permanente, d'un traumatisme létal, nous ne pouvons le dire le problème étant très complexe. D'après LEA (9) "Il semble évident que l'effet de la radiation par l'inhibition de la division est due à un changement chimique dans la cellule. Mais il n'est pas encore clair si le changement est consiste essentiellement dans la destruction ou la production de quelques substance ayant un effet inhibitoire". Cependant W.D. BELLAMY (6) nous montre l'effet létal comme la conséquence d'un traumatisme génétique.

L'effet des radiations sur les micro-organismes fut l'objet de travaux très intéressants de WOLFGANG HUBERT (8). Il fait une excellente mise au point des notions admises aujourd'hui, en décomposant l'effet des radiations de haute énergie sous forme de paramètres. L'étude des effets des radiations se fait d'une façon indirecte.

L'effet des radiations peut se subdiviser en deux groupes : Les paramètres inhérents aux radiations et les paramètres étrangers aux radiations nous allons les étudier tour à tour.

Les paramètres inhérents aux radiations considérés comme effets directs des radiations se traduisent par une ionisation. L'absorption du rayonnement produit un

trouble de l'équilibre chimique. Le résultat est la formation d'espèces chimiques différentes de celles présentes originellement. Ceci serait l'effet de l'Energie Linéaire de Transfert ou L.E.T. (Linear Energy of Transfert) ZIRKLE (14). Un autre paramètre inhérent aux radiations est la vitesse des électrons : La vitesse des électrons a un effet direct, c'est pour nous le seul paramètre connu et variable. Pour un microscope électronique classique fonctionnant sous une tension d'accélération de 80 Kv, nous avons presque toujours une action létale (Les spores de Bacillus Subtilis ont seules résisté à cette vitesse des électrons). Pour un microscope fonctionnant sous très haute tension, 750 Kv et 1000 Kv donc pour des électrons fortement accélérés nous avons obtenu des cultures post-électroniques trois fois sur cinq.

Les paramètres étrangers aux radiations sont inhérents au milieu. Dans le cas présent le milieu est représenté par le petit volume de la cellule. Quels sont les facteurs en présence ? L'air, donc un peu d'oxygène. Un peu d'eau, puisque les bactéries sont humides. Le facteur chaleur peut lui aussi intervenir.

L'oxygène peut-il jouer un rôle ? Wolfgang HUBERT (8) rapporte les travaux de Howard FLANDERS sur l'effet oxygène. Ces auteurs ont remarqué que l'effet oxygène augmente l'effet néfaste des électrons sur les bactéries. Effet néfaste qui se traduit par un manque de culture. Il n'y a pas de formation de colonies. Notre cellule renferme bien peu d'oxygène, il semble difficile de faire ici la part de son action.

L'action indirecte ne se borne pas au seul effet oxygène. Nous allons examiner maintenant le role que peut jouer l'humidité dans la cellule. La quantité d'eau est très réduite puisque nous sommes en présence d'humidité ambiante et non pas de liquide. L'opinion de WOLFGANG - HUBERT & W.D. BEILAMY (3) et (6) concernant les micro-organismes est que, ils sont plus résistant à l'état sec qu'en suspension aqueuse. Il est à noter que M.W. HUBERT (8) dit également que les enzymes sont moins sensibles aux radiations dans les préparations humides. Nous pensons que pour l'étude des bactéries nous sommes donc dans le cas le plus favorable à la survie.

L'action indirecte comporte en dehors de l'effet oxygène, de l'humidité un autre facteur : La température. La température qui peut régner dans la cellule à l'intérieur du microscope électronique n'as pas été mesurée. Elle est probablement peu différente de la température de pousse normale des bactéries. Nous savons que dans un vide poussé la température peut avoir un effet très prononcé sur la sensibilité aux radiations. Dans la cellule employée les bactéries ne sont pas dans le vide mais à la pression atmosphérique.

En résumé le seul paramètre que nous pouvons faire varier est la vitesse des électrons. Tous les autres paramètres, peuvent être groupés, que leur action soit directe ou indirecte, sous le vocable "effet électronique". Tous ces facteurs sont liés entre eux d'une part et ils sont également liés d'autre part à la vitesse des électrons donc ils sont fonction de la tension d'accélération sous laquelle fonctionne le microscope.

Nous pouvons en dernier lieu affirmer que les électrons fortement accélérés n'ont pas eu d'effet létal constant sur les bactéries examinées. Que ce soit sous une tension d'accélération de 750 Kv ou une tension de 1000 Kv, nous avons obtenu une culture post-électronique en repiquant sur milieu neuf. Sur les germes non sporulés vivants au moment de l'examen l'effet électronique a entrainé quelques modifications morphologiques et culturelles (Corynébactérium Diphtéries, Mitis et P.W.8). L'avenir nous dira en fonction du temps si ces modifications sont de caractère transitoire ou non. Les germes sporulés après examen et repiquage post-électronique ont donné des cultures fort peu différentes des souches d'origine (Bacillus Subtilis et Bacillus Anthracomorphe).

Ce que il y a dix ans T. REIS (10) donnait comme une probabilité est devenu aujourd'hui une réalité. Le microscope électronique fonctionnant sous très haute tension permet d'observer vivant sans aucun artéfact de préparation les bactéries dans leur état naturel (pas d'ombrage, pas de deshydratation, pas d'éclatement de membranes). Le grand Microscope Electronique de Toulouse, fonctionnant sous des tensions exceptionnellement élevées, construit sous la di-

rection de M. le Professeur G. DUPOUY, membre de l'Institut, avec la collaboration de M. le Professeur F. PERRIER et de M.M. DURRIEU et FABRE Ingénieurs au Laboratoire d'Optique Electronique du Centre National de la Recherche Scientifique (5) nous a permis de vérifier le comportement théoriquement attendu des bactéries examinées sous une tension d'accélération de 750 Kv et 1000 Kv.

Notre travail a consisté a étudier ces mêmes germes sous la tension habituelle en microscopie électronique classique de 80 Kv.

Nous connaissons les travaux Russe de Mme STOJANOVA et Mme NEKRASOVA (12) concernant l'examen de micro-organismes vivants à l'aide de mocro-chambre à gaz. Nous remarquons dans ce travail que l'observation se réduit à une irradiation électronique, suivie d'une autre irradiation électronique et ceci répété plusieurs fois. Pendant les intervalles de temps les micro-organismes sont placés dans un milieu frais. Ce sont toujours les mêmes échantillons qui sont observés. Le processus mis ainsi en évidence peut être un mécanisme de récupération du micro-organisme étudié vers un élément viable post-électronique. Mais ce peut être aussi un processus de dégénérescence qui entraine la mort du micro-organisme ainsi que LEA (9). W. HUBERT (8) et W.D. BELLAMY (6) le signalent. Il ne faut pas perdre de vue qu'après une irradiation la mort de la cellule n'est pas immédiate.

Nous avons maintenant la possibilité d'examiner au microscope Electronique fonctionnant sous très haute Tension des germes vivants. L'emploi de la très haute tension et d'un porte-objet spécial apportent à l'échelle électronique ce que le contraste de phase avait apporté à la microscopie optique. Un nouveau domaine de recherches s'ouvre devant nous.

RESUME - CONCLUSIONS

Ce travail concerne l'étude de la survie de bactéries sporulées et non sporulées après examen en microscopie électronique.
Les examens bactériologiques portent sur les germes recueillis par prélèvement central de la préparation examinée au microscope électronique.

Après examen au microscope électronique fonctionnant sous une tension d'accélération de 80Kv, les prélèvements des germes déposés entre les deux membranes d'un sandwich restent stériles, à l'exception d'une seule culture provenant de spores de Bacillus Subtilis.

Après examen au microscope électronique fonctionnant sous une tension d'accélération de 750 Kv et 1000Kv, les prélèvements des germes déposés dans la cellule porte-objet du Professeur G. DUPOUY, donnent une culture post-électronique dont nous discutons les aspects et la signification.

Vu :
Le Président de Thèse
ANDRIEU

Vu :
Le Doyen
LAZORTHES

Vu et permis d'imprimer
Toulouse, le 16 Mars 1962

Le Recteur,
Président du Conseil de l'Université,

DOTTIN

FIGURE N° 1

CORYNEBACTERIAE DIPHTERIAE P W. 8

Morphologie classique de Corynébactériae P W. 8 , Avec granulations polaires bien visibles dans une culture âgée

Suspension en eau distillée d'une culture sur gélose au dixième jour d'étuve à 37

Dépôt sur grille avec support parlodion-carbone, préparation non ombrée Examen au microscope électronique ELMISKOP SIEMENS 80 Kv

G. direct 12 000
G photo 28 000

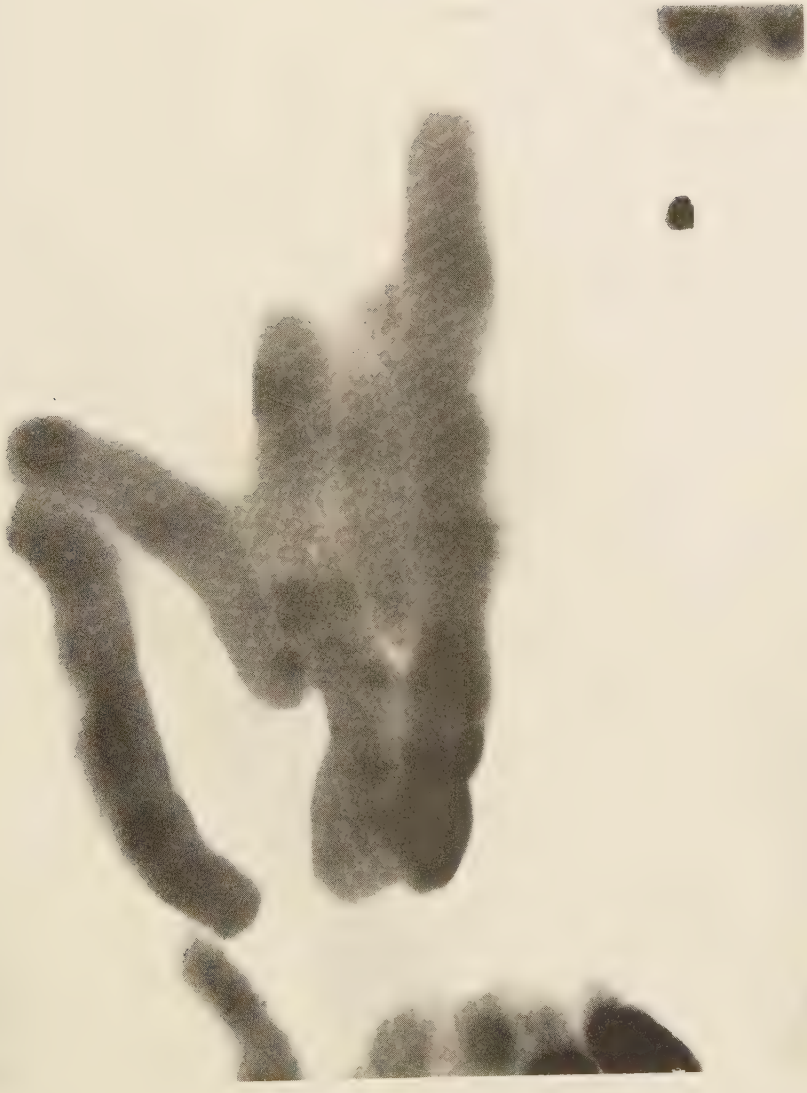

FIGURE N° 2

CORYNEBACTERIUM DIPHTERIAE P.W. 8

Culture "post-électronique"

Morphologie très transformée, germe cocobacillaire, rares granulations polaires.

Suspension en eau distillée identique à celle de la figure 1, examiné en cellule au Microscope Electronique fonctionnant sous très Haute Tension, prélevé et mis en culture à 37°.

Dépôt sur grille, préparation non ombrée examinée au microscope électronique ELMISKOP SIEMENS 80 Kv.

G. direct 12.000
G. photo 30.000

FIGURE N° 3

CORYNEBACTERIUM DIPHTERIAE P.W. 8

Morphologie classique de Corynébacteriae Diphtériae P.W 8, sans granulations polaires visibles, dans une culture jeune.

Technique des pseudo-répliques avec prélèvement sur gélose après deux heures d'incubation à 37°.

Film de carbone recouvrant les germes sur grille, examen au microscope électronique ELMISKOP SIEMENS, 80 Kv.

G. direct 12.000
G. photo 30.000

FIGURE N° 4

CORYNEBACTERIUM DIPHTERIAE P.W. 8

Culture "post-électronique"

Morphologie cocobacillaire en culture jeune.

La figure N° 4 montre le germe quarante jours après l'examen en cellule au Microscope Electronique fonctionnant sous très Haute Tension, et plusieurs repiquages sur gélose.

Technique des pseudo-répliques avec prélèvement sur gélose après deux heures d'incubation à 37°.

Film de carbone recouvrant les germes sur grille, examen au microscope électronique ELMISKOP SIEMENS 80 Kv.

G. direct 12.000
G. photo 27.000

BIBLIOGRAPHIE

1 - DARGENT R.
Films support et techniques d'empreintes en microscopie électrónique.
Thèse de Doctorat ès Sciences Physiques. Faculté des Sciences. Toulouse 21 Février 1957.

2 - DARGENT R., DURRIEU L. et Mme RZEPKA J. -
Film de parlodion - carbone utilisables en microscopie électronique.
C.R. Acad. Sc. Transmis par M.G. DUPOUY 1959 218962/ 964.

3 - DUPOUY G., PERRIER F. et DURRIEU L. -
L'observation de la matière vivante au moyen d'un microscope électronique fonctionnant sous très haute tension.
C.R. Acad. Sc. 1960. 251 2836/ 2841.

4 - DUPOUY G., PERRIER F. et DURRIEU L. -
Etude sur la contamination dans un microscope électronique (Laboratoire d'Optique Electronique Toulouse).
Colloque annuel de la Société de Microscopie Electronique de Toulouse Fév. 1962. Brunissens Imp.

5 - DUPOUY G. PERRIER F. et FABRE R. -
Microscope électronique fonctionnant sous très haute tension. C.R. Acad. Sc. 1961, 252 627/ 632.

6 - BELLAMY W.D.
Préservation of foods and drugs by ionizing radiations. Applied microbiology. 1961. 1. 49 / 73.

7 - HILLIER J., KNAYSI G. et BAKER R. -
Nouvelles techniques de préparation des bactéries pour le microscope électronique.
Journal of Bactériology 1948. II.

8 - HUBERT W.
High energy radiations in biochemistry and microbiology. Nuclear Instruments et Methods 1961. II. 210/ 223

9 - LEA D E
Action of radiations on living cells.
Cambridge Univ. Press. London 1947.

10 - REIS T.
Le microscope électronique et ses applications.
Presses Universitaires de France. 1950

11 - SCOTT D.B. et WYCKOFF R.G. -
Carbon surface replica for électron microscopy and electron diffraction
Journal of the Royal Microscopical Society
1956. LXXV. 217/221

12 - STOJANOVA et NEKRASOVA.
En russe
Sur les micro-organismes vivants étudiés au microscope électronique à l'aide de microchambres à gaz
DOKL. AKAd. Nank. SSR 1960. 134. 467 / 470

13 - WEBB R.B., POWERS E.L. et EHRET E.V.
Thermorestauration of radiation damage in dry bacterial spores
Rad. Res. 12 1960. 682

14 - ZIRKLE R.E.
The radiobiological importance of the energy destruction along ionisation tracks.
Journol. Cell. Comp. Physiol. 16 - 1990 -221.

TABLE DES MATIERES

AVANT-PROPOS 1

I - INTRODUCTION 2

II - METHODES ET TECHNIQUES EMPLOYEES 4

A) Techniques spéciales d'observation 4

1° M.E.H.T. "Cellule" 4

2° SIEMENS "Sandwich" 6

B) Techniques pour l'étude de la morphologie 8

1° Dépôt sur grille 8

2° Dépôt ombré 8

3° Pseudo-répliques 8

C) Techniques de prélèvement 10

D) Méthode de stérilisation. 11

III - TEMOINS 13

Témoin "morphologie" 13

Témoin "vide électronique" 14

Témoin "Cellule" et "Sandwich" 15

IV - SURVIE DES BACTERIES ET DES SPORES, ETUDE FAITE A L'AIDE D'UN MICROSCOPE ELECTRONIQUE FONCTIONNANT SOUS TRES HAUTE TENSION 17

1° Tension de 750 Kv 17

A) Germe sporulé 17

Bacillus Subtilis A.T.C.C. 66 33. 17

Bacillus Anthracomorphe. 19

B) Germe non sporulé 20

Corynebacterium Diphteriae type Mitis 20

2° TENSION de 1.000 Kv 24

A) Germe sporulé 24

Bacillus Subtilis A.T.C.C. 66 33 24

B) Germe non sporulé 25

Bacillus Subtilis A.T.C.C. 66 33 25

Corynebacterium Diphteriae P.W. 8 27

V - SURVIE DES BACTERIES ET DES SPORES, ETUDE FAITE A L'AIDE D4 UN MICROSCOPE FONCTIONNANT SOUS UNE TENSION de 80 Kv 32

A) Germe sporulé 32

Bacillus Subtilis A.T.C.C. 66 33 32

B) Germe non sporulé 36

Escherichia coli 36

Proteus Mirabilis 37

Corynebacterium Diphteriae type Mitis 38

Corynebacterium Diphteriae P.W. 8 38
Micobacterium Phlei 39

VI - DISCUSSION 41

RESUME - CONCLUSION 46

VII - Figures 1 - 2 - 3 - 4 47 à 51

BIBLIOGRAPHIE 55